

**INSTITUT FÜR MEDIZINISCHE VIROLOGIE
FACHBEREICH HUMANMEDIZIN
JUSTUS-LIEBIG-UNIVERSITÄT GIEßEN**

**Spaltung der Hepatitis-B-Virus
Oberflächenproteine durch hepatozelluläre
Proteasen**

**Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaftlichen
Fakultäten
(Fachbereich Biologie)
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

vorgelegt von
SYLVIA NITSCHKE
aus Friedrichsdorf

Gießen, 2000

Dekan: Prof. Dr. R. Renkawitz

1. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Pingoud

2. Berichterstatter: Prof. Dr. W.H. Gerlich

Tag der mündlichen Prüfung:

10.11.2000

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	7
1.1 Verlauf der Hepatitis-B-Infektion	8
1.2 Hepatitis-B-Virus	9
1.3 Hepadnaviren	9
1.4 Struktur des Virus und der Antigenpartikel	11
1.5 Genomorganisation des Hepatitis-B-Virus	13
1.6 Transkription und Expression der viralen Proteine	14
1.7 Replikation des Hepatitis-B-Genoms	16
1.8 Viruskodierte Proteine	17
1.8.1 Die Region C	17
1.8.2 Die Region P	18
1.8.3 Die Region X	19
1.8.4 Die Region S	19
1.8.4.1 Eigenschaften und Topologie des SHBs-Proteins	21
1.8.4.2 Eigenschaften und Topologie des MHBs-Proteins	23
1.8.4.3 Eigenschaften und Topologie des LHBs-Proteins	24
1.9 Besonderheiten der Leberstruktur	26
1.10 Endozytose	27
1.11 Bindung und Aufnahme des Virus	29
1.12 Virale Fusionsproteine und ihre Aktivierung	32
1.13 Ansätze und Ziele dieser Arbeit	34
 2 Material und Methoden	 35
2.1 Chemikalien	35
2.2 Puffer und Stammlösungen	35
2.2.1 Puffer	35
2.2.2 Lösungen zur SDS-Gelelektrophorese	35
2.2.3 Lösungen zur Silberfärbung	36
2.2.4 Blot-Transferpuffer	36
2.2.5 Chemilumineszenz Substrat (ECL)	36
2.2.6 Zellkulturmedium	36
2.3 Antikörper	37
2.3.1 Primäre monoklonale Antikörper	37
2.3.2 Sekundäre Antikörper	38

2.4 Zellkultur	38
2.5 Leberproben	39
2.6 Plasma als Quelle von HBsAg	39
2.7 Aufreinigung von Viren, Filamenten und Sphären durch Dichtegradientenzentrifugation	40
2.7.1 Erster Reinigungsschritt: Trennung von Viren, Filamenten und Sphären	40
2.7.2 Zweiter Reinigungsschritt: Abtrennung von Fremdprotein von Filamenten	41
2.7.3 Dritter Reinigungsschritt: Abtrennung von Restprotein von Filamenten	41
2.7.4 Anreicherung der Partikel durch Ultrafiltration	42
2.8 Elektronenmikroskopie	42
2.9 Homogenisierung von Leberzellen	43
2.9.1 Homogenisieren von Leberstücken aus Schwein und Mensch	43
2.9.2 Homogenisieren von Leberzellen aus Zellkultur	43
2.9.3 Trypanblau Test	43
2.10 Subzelluläre Fraktionierung im Zonalrotor	44
2.10.1 Dichtebestimmung	45
2.10.2 Alkalische- und Saure Phosphatase Reaktion	46
2.10.3 Proteingehalt Bestimmung mittels BCA Assay	47
2.11 Proteolytische Spaltung von HBsAg-Filamenten durch hepatozelluläre Proteasen	47
2.11.1 Konzentrationsabhängigkeit	48
2.11.2 Kinetik der proteolytischen Spaltung	48
2.11.3 pH-Abhängigkeit	48
2.11.4 Inhibition der proteolytischen Spaltung	48
2.12 ELISA zur Bestimmung der Proteaseaktivität von Subzellulären Fraktionen	49
2.13 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	50
2.14 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen	51
2.15 Trocknen von Polyacrylamidgelen	51
2.16 Elektroblothing	51
2.17 Immunblot	52
2.18. Interaktion von proteolytisch verdautem HBsAg mit der Hepatom Zelllinie HepG2	53

3 Ergebnisse	54
3.1 Aufreinigung von Filamenten aus Serum HBV infizierter Patienten	54
3.1.1 Erster Schritt: Ratenzonale Sedimentation	54
3.1.2 Zweiter Schritt: Cäsiumchlorid-Flotation	56
3.1.3 Dritter Schritt: Ratenzonale Sedimentation	58
3.1.4 Abschließende Reinigung durch Ultrafiltration	60
3.1.5 Elektronenmikroskopische Aufnahme der gereinigten Filamente	61
3.2 Subzelluläre Fraktionierung von Leberzellen	62
3.3 Spaltung von HBsAg-Filamenten durch hepatozelluläre Proteasen	66
3.4 pH-Abhängigkeit der proteolytischen Spaltung	71
3.5 Proteolytische Spaltung mit und ohne Aufschluss der Organellen	73
3.6 Konzentrationsabhängigkeit der proteolytischen Spaltung	75
3.7 Inhibition der proteolytischen Aktivität	77
3.8 Western Blot zur Charakterisierung der proteolytischen Spaltung	79
3.9 Kinetik der proteolytischen Spaltung	80
3.10 Detektion der MHBs Schnittstelle für hepatozelluläre Proteasen	84
3.11 Interaktion von proteolytisch behandelten HBsAg-Filamenten mit HepG2-Zellen	86
4 Diskussion	89
4.1 Reinigung von HBV-Partikeln	89
4.2 Subzelluläre Fraktionierung	90
4.3 Spaltung des HBsAg durch Proteasen aus humaner und porciner Leber	91
4.3.1 Proteolytische Aktivität der verschiedenen subzellulären Fraktion gegenüber HBsAg-Filamenten	91
4.3.1.1 pH-Abhängigkeit der proteolytischen Spaltung	93
4.3.1.2 Proteolytische Spaltung mit und ohne Aufschluss der Organellen	93
4.3.1.3 Konzentrationsabhängigkeit der proteolytischen Spaltung	94
4.3.1.4 Kinetik der proteolytischen Spaltung	95
4.4 Inhibition der proteolytischen Spaltung	95
4.5 Charakterisierung der Spaltstelle im MHBs	96
4.6 Vergleich der Proteasen aus humaner und porciner Leber	97
4.7 Vergleich von Proteasen aus Lebergewebe mit Proteasen aus HepG2-Zellen	97
4.8 Interaktion von proteolytisch behandelten HBsAg-Filamenten mit HepG2-Zellen	99

5 Zusammenfassung	101
6 Literatur	102
7 Abkürzungen	115

1 Einleitung

Hepatitis (Entzündungen der Leber) können durch toxische Agentien (z.B. Alkohol, Medikamente), durch Autoimmunreaktionen oder am häufigsten durch infektiöse Agentien hervorgerufen werden. Dabei kann es sich um Bakterien (z.B. Leptospiren), Protozoen (z.B. Amöben), Helminthen (z.B. Echinokokken) oder Viren handeln. Zu den Hepatitis hervorrufenden Viren zählen viele Vertreter der Herpesvirusfamilie, die jedoch keinen typischen Lebertropismus haben. Die eigentlichen Hepatitis-Viren A, B, C, D und E vermehren sich dagegen bevorzugt oder ausschließlich in Hepatocyten. Diese Viren rufen zwar ähnliche Symptome hervor, unterscheiden sich aber in ihren biologischen und molekularen Eigenschaften grundlegend.

Schon in der ersten Hälfte dieses Jahrhunderts war bekannt, dass mindestens zwei Typen von Hepatitis-Erregern existieren, wobei der Typ A fäkal-oral übertragen wurde, 4 Wochen Inkubationszeit hatte und nicht chronisch wurde, der Typ B hingegen parenteral übertragen wurde, bis zu 6 Monaten Inkubationszeit hatte und häufig chronisch wurde. Typ B wurde wegen der parenteralen Übertragung auch Serum-Hepatitis genannt. In den siebziger Jahren wurden die Hepatitis-A-Viren und Hepatitis-B-Viren entdeckt. Bald danach stellte sich heraus, dass es noch weitere Viren gab, die Hepatitis verursachen können. Solange sie noch nicht identifiziert waren, wurden sie zunächst als „nonA, nonB“ bezeichnet. Heute kennt man das Hepatitis-A-, -B-, -C-, -D- und -E-Virus.

Ein Vergleich der Viren aus einem Lehrbuchbeitrag von Gerlich und Thomssen ist in Tabelle 1.1. aufgeführt. Dort ist auch das GB-C Virus mitaufgenommen, das auch als „Hepatitis G Virus“ bezeichnet wird, höchstwahrscheinlich aber keine Hepatitis hervorruft.

Tab. 1.1 Vergleich der humanen Hepatitis Viren

	HEPATITIS A	HEPATITIS B	HEPATITIS C	HEPATITIS D	HEPATITIS E	GB-C
Virusfamilie	Picorna	Hepadna	Flavi	Viroid ähnlich	Calici verwandt	Flavi
Genus	Hepato	Orthohepadna	Hepaci	Deltavirus	-	Hepaci ähnlich
Viriongröße	30 nm	47nm*	50 nm**	36 nm	34 nm	45 nm
Genomtyp	+ RNA	ds/ssDNA, zirkulär	+ RNA	-RNA zirkulär	+ RNA	+RNA
Genomgröße	7,8 kb	3,2 kb	9,4 kb	1,7 kb	7,5 kb	9,4 kb
Hüllproteine	Keine	3 Hüllproteine (HBsAg)	2 Hüllproteine (E1, E2)	2 Hüllproteine (HBsAg)	Keine	2 Hüllproteine (E1, E2)
Übertragung	fäkal-oral	parenteral	parenteral	parenteral	fäkal-oral	parenteral
Chronizität	nie	häufig	sehr häufig	sehr häufig	nie	häufig

(nach Gerlich und Thomssen)

*nach D. Glebe; ** nach C. Jursch

1.1 Verlauf der Hepatitis-B-Infektion

Der Verlauf einer HBV-Infektion ist sehr variabel. Bei gesunden Erwachsenen verläuft die akute Infektion in ca. 65% der Fälle symptomlos, d. h. ohne Krankheitszeichen mit anschließender Viruseliminierung. Nur bei 20-30% der Patienten beobachtet man eine akute Hepatitis mit den typischen Krankheitssymptomen.

Die akute oder chronische Hepatitis beginnt in der Regel mit Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen, sowie starker Müdigkeit, Appetitlosigkeit und Unwohlsein. Es folgt meist das ikterische Stadium mit Gelbsucht, während die übrigen Beschwerden langsam zurückgehen. Als Gelbsucht (Ikterus) bezeichnet man die Gelbfärbung der Haut, die auf einer Anreicherung der Gallenfarbstoffe im Blut und Ablagerung von Bilirubin im Gewebe beruht. Bilirubin ist ein Abbauprodukt des Blutfarbstoffs Hämoglobin, das wegen der Leberparenchymschädigung nicht mehr ausreichend in die Galle ausgeschieden werden kann. Die Gelbsucht kann aber bei geringerem Schweregrad der Infektion auch fehlen (anikterische Hepatitis).

Bei 90-95% der Patienten bildet sich die Gelbsucht nach einigen Wochen zurück und die Erkrankung heilt aus.

In seltenen Fällen kann eine akute Hepatitis fulminant verlaufen, wobei es zu einem Leberzerfallskoma und häufig zum Tod kommt (Kaboth et al., 1980; Dienstag, 1984; Beasley u. Hwang, 1984).

In 5-10% der Fälle entwickelt sich eine chronische Hepatitis. Die chronische Hepatitis kann jahrelang ohne wesentliche klinische Symptome persistieren, sie kann aber auch

in die aggressive Form übergehen, die sich zur Leberzirrhose bis hin zum Leberkrebs oder Leberkoma ausweiten kann.

Die Krankheitssymptome des akuten und chronischen Stadiums einer HBV-Infektion beruhen auf der zellvermittelten Immunabwehr des Wirtsorganismus (Chisari und Ferrari, 1995) oder nach langandauernder Infektion auf der malignen Transformation von Leberzellen.

1.2 Hepatitis-B-Virus

Der Ethnologe B.S. Blumberg entdeckte 1965 bei der Suche nach genetischen Polymorphismen ein unbekanntes Antigen im Serum eines australischen Ureinwohners und nannte es „Australia Antigen“ (AuAg). Bald darauf stellte sich heraus, dass dieses Antigen mit der Hepatitis-B korreliert (Blumberg et al, 1967). 1970 identifizierte D.S. Dane das infektiöse Agens als Viruspartikel, weshalb diese auch Dane-Partikel genannt werden (Dane, 1970). Dane zeigte, dass sich das AuAg auf der Oberfläche des Hepatitis-B-Virus befindet. Daher wird es seit 1972 als Hepatitis-B-surface-antigen (HBsAg) bezeichnet.

Das Hepatitis-B-Virus (HBV) stellt auch heute noch weltweit ein großes gesundheitliches Problem dar. Nach Schätzungen der WHO (World Health Organisation) sind ca. 350 Millionen Menschen chronische Virusträger (www.who.int.html 1998) und beinahe die Hälfte der Weltbevölkerung hat einmal Kontakt mit dem Virus gehabt (Kann und Gerlich, 1998). Im mitteleuropäischen Raum ist der Anteil der chronisch Infizierten HBV-Träger relativ gering, während er in Südostasien und in großen Teilen Afrikas bis zu 20% der Bevölkerung beträgt. In der Liste der häufigsten Todesursachen durch Infektionen steht das Hepatitis-B-Virus an fünfter Stelle (Kann und Gerlich, 1998).

1.3 Hepadnaviren

Die Hepadnaviren besitzen einen ausgeprägten Hepatotropismus, ein sehr enges Wirtsspektrum und verursachen oft chronische Infektionen (Robinson, 1991; Feitelson, 1986). Bei allen Hepadnavirusinfektionen werden von den infizierten Leberzellen neben den eigentlichen Viren große Mengen nicht infektiöser Partikel produziert (Dane, 1970; Mason, 1980; Marion, 1980; Summers, 1978). Neben dem HBV des Menschen gehören zu der Familie der Hepadnaviridae einige andere Säuger-Hepatitisviren, die zum Genus Orthohepadnavirus zusammengefasst werden. Hepadnaviren, die aus

Vögeln isoliert wurden, werden der Gruppe Avihepadnavirus zugerechnet. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die derzeit bekannten Hepadnaviren.

Tab. 1.2 Tabellarische Übersicht aller bekannten Hepadnaviren

ORTHOHEPADNAVIRUS	SPEZIES	ERSTBESCHREIBUNG
Hepatitis-B-Virus (HBV)	Mensch <i>Homo sapiens sapiens</i>	Dane et al. (1970)
Chimpanzee Hepatitis-B-Virus (ChHBV)	Schimpanse <i>Pan troglodytes</i>	Vaudin et al. (1988)
Gibbon Hepatitis-B-Virus (GiHBV)	Weißhandgibbon <i>Hylobates lar</i>	Norder et al. (1996)
Orangutan Hepatitis-B-Virus (OuHBV)	Orang-Utan <i>Pongo pygmaeus pygmaeus</i>	Warren et al. (1999)
Gorilla Hepatitis-B-Virus (GoHBV)	Gorilla <i>Gorilla gorilla</i>	Grethe et al. (2000)
Woolly Monkey Hepatitis-B-Virus (WMHBV)	Wollaffe <i>Lagothrix lagotricha</i>	Lanford et al. (1998)
Woodchuck Hepatitis Virus (WHV)	Waldmurmeltier <i>Marmota monax</i>	Summers et al. (1978)
Groundsquirrel Hepatitis Virus (GSHV)	Erdhörnchen <i>Spermophilus beecheyi</i>	Marion et al. (1980)
Arctic Groundsquirrel Hepatitis Virus (ASHV)	Arktisches Hörnchen <i>Spermophilus parryi kennicotti</i>	Testut et al. (1996)
AVIHEPADNAVIRUS	SPEZIES	ERSTBESCHREIBUNG
Duck Hepatitis-B-Virus (DHBV)	Pekingente <i>Anas domesticus</i>	Mason et al. (1980)
Heron Hepatitis Virus (HHBV)	Graureiher <i>Adria cinerea</i>	Feitelson et al. (1986)
Ross Goose Hepatitis Virus (RGHV)	Ross-Gans <i>Anser rossi</i>	Testut et al. (1996)
Snow Goose Hepatitis-B-Virus (SGHBV)	Schneegans <i>Anser caerulescens</i>	Chang et al. (1999)
Maned Duck Hepatitis-B-Virus (MDHBV)	Mähnenente <i>Chenonetta jubata</i>	Li et al. (1998)
Grey Teal Hepatitis-B-Virus (GTHBV)	Weißkehlente <i>Anas gibberifrons gracilis</i>	Li et al. (1998)
Stork Hepatitis-B-Virus (STHBV)	Weißstorch <i>Ciconia ciconia</i>	Pult et al. (1998)

1.4 Die Struktur des Virus und der Antigenpartikel

HBV erscheint im Elektronenmikroskop nach Negativkontrastierung als doppelschaliges rundes Gebilde, dessen Durchmesser bei Erstbeschreibung von Dane et al. (1970) mit 42 nm angegeben wurde. Nach noch nicht publizierten Messungen von D. Glebe und B. Boschek am Inst. f. Med. Virologie Gießen beträgt der Durchmesser jedoch 47 nm. Im nativen hydratisierten Zustand hat das HBV-Partikel sogar einen Durchmesser von 52-55 nm (Promotion C. Jursch, 2000). Das Virus ist von einer Lipidhülle umgeben, in der die Hepatitis-B Surface (HBs) Proteine verankert sind (Almeida et al., 1971). Im Inneren des Virus befindet sich das ca. 28 nm große ikosaedrische Core-Partikel, das die virale Nukleinsäure enthält (Robinson et al., 1974). Am 5'Ende des kodierenden DNA Stranges befindet sich ein kovalent gebundenes Protein (Gerlich u. Robinson, 1980) mit einer endogenen DNA-Polymerase-Aktivität (Kaplan et al., 1973). Außerdem ist eine Protein-Kinase-Aktivität zu beobachten (Albin u. Robinson, 1980; Gerlich et al., 1982).

Neben den infektiösen Virionen findet man im Serum infizierter Personen, wie bereits oben erwähnt, große Mengen nicht infektiöser Partikel. Diese Partikel enthalten außer den HBs Proteinen keine weiteren viralen Proteine und auch keine Nukleinsäuren. Sie kommen in deutlich größeren Mengen vor als die infektiösen Virionen. Diese nicht infektiösen Partikel kommen in zwei Formen vor: als sphärische Partikel mit einem Durchmesser von ca. 20-25 nm und als Filamente mit variabler Länge (Robinson, 1977). Wegen des hohen Lipidgehaltes und der fehlenden Nukleinsäure haben die Partikel eine geringere Dichte als die Virionen und lassen sich daher im Dichtegradienten von diesen trennen (Gerin et al., 1971; Kaplan et al., 1975). Das HBV ist in unterschiedlichen Konzentrationen im Blut infizierter Patienten vorhanden. Pro Milliliter Blut finden sich bis zu 10^{10} Viruspartikel, 10^{11} Filamente und 10^{14} Sphären.

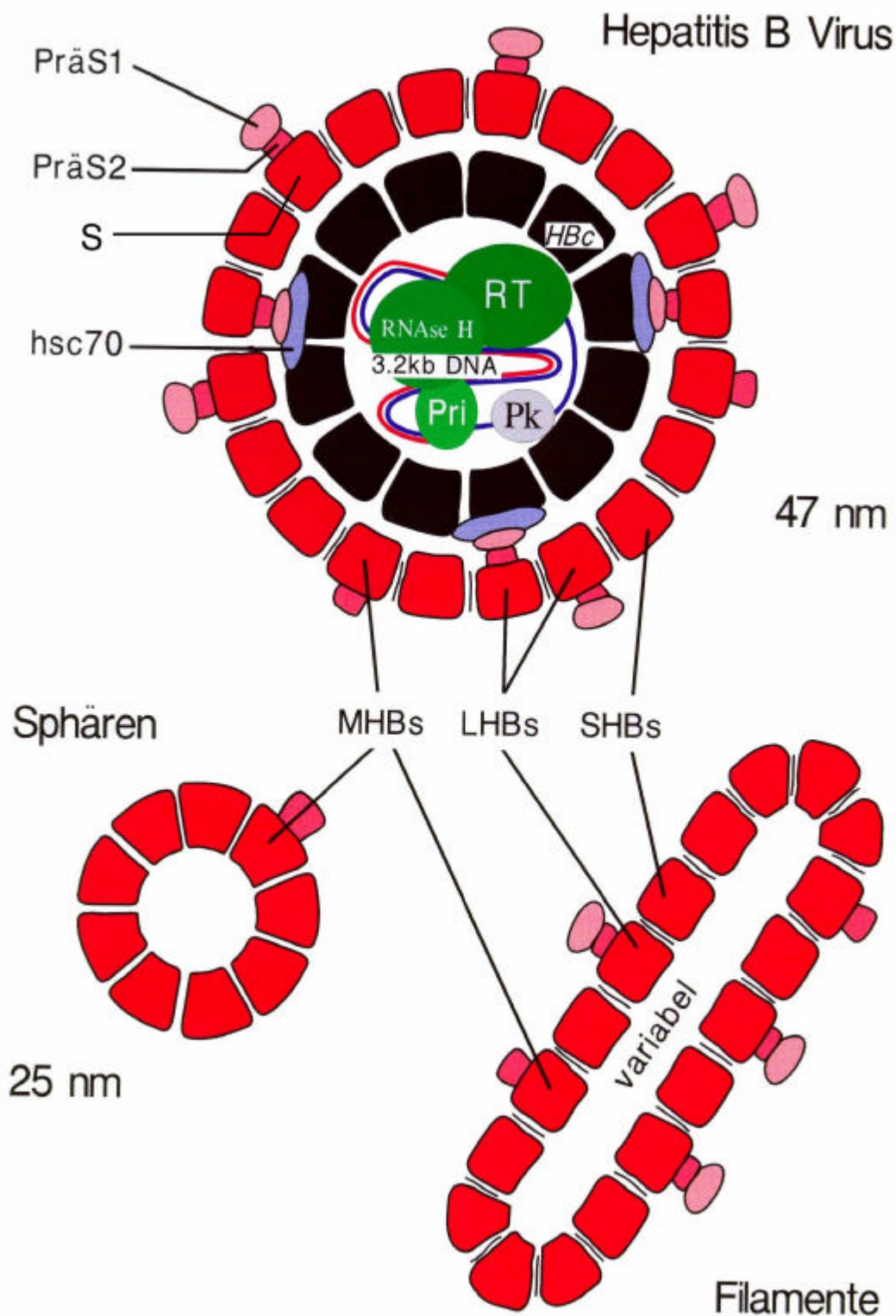


Abb. 1.1 Schematische Darstellung der drei verschiedenen Partikel, die im Blut Hepatitis-B-infizierter Personen zu finden sind. LHBs, MHBs, SHBs: Large- (großes-), Middle- (mittleres-), Small (kleines) Hepatitis B Surface Protein; HBc: Hepatitis B Core Protein; hsc 70: Heat Shock Cognate 70; Pk: Protein-Kinase; Pri: Primer-Protein; RT: Reverse Transskriptase; PräS1, PräS2: PräS1-, PräS2-Domäne; S: S-Domäne (Haupthüllprotein) (nach M. Kann u. W. Gerlich, 1998, modifiziert)

1.5 Genomorganisation des Hepatitis-B-Virus

Das Hepatitis-B-Virus besitzt mit etwa 3200 Nukleotiden eines der kleinsten Genome aller bekannten Viren. Die Anzahl der Nukleotide variiert je nach Subtyp zwischen 3182 und 3221 Nukleotiden (Tiollais et al., 1981). Die geringe Größe wird durch eine sehr komplexe Anordnung der einzelnen Gene erreicht, die sich in verschiedenen Leserastern über die halbe Länge des Genoms überlappen.

Das Genom besteht aus einer partiell doppelsträngigen, zirkulären DNA (Summers, 1975). Der kodierende Minusstrang ist mit ca. 3200 Nukleotiden komplett, während der komplementäre Plusstrang mit einer variablen Länge von nur 1000 bis 2500 Nukleotiden unvollständig ist (Hruska et al., 1977; Landers et al., 1977). Die Sekretion des Virus erfolgt vor der Fertigstellung des Plusstranges durch die endogene DNA-Polymerase. Daher hat der Plusstrang ein definiertes 5'Ende aber ein variables 3'Ende. Die zirkuläre Form des Genoms kommt nicht durch kovalente Verknüpfung der beiden Enden des Minusstranges zustande, sondern die beiden Enden dieses Stranges werden vom Plusstrang überspannt (Sattler u. Robinson, 1979). Die beiden Enden des Minusstranges überlappen in einem Bereich von 9 Basen (terminale Redundanz), so dass das Genom in diesem Bereich sogar dreisträngig vorliegt (Will et al., 1987). Am 5'Ende des Minusstranges ist kovalent ein Protein gebunden (Gerlich u. Robinson, 1980). Das 5'Ende des Plusstranges besteht aus 18 Ribonukleotiden die eine mRNA-ähnliche Cap-Struktur aufweisen (Seeger et al., 1986). Beide 5'terminalen Strukturen übernehmen bei der Replikation Primerfunktion (Hu et al., 1997; Seeger u. Hu, 1997). Weiterhin enthält das Genom zwei 11 Basen lange direkt wiederholte Sequenzen (direct repeats, DR1 u. DR2), die eine Rolle bei der Replikation spielen (Summers, 1984; Siddiqui et al., 1979; Will et al. 1987).

Das Genom des HBV kodiert für vier offene Leserahmen (open reading frames, ORF), es sind der C- (Core), P- (Polymerase), S- (Surface) und X- Bereich. Sie werden in Kapitel 1.7 vorgestellt.

vorliegt (Bock et al., 1994; Newbold et al., 1995). Die Synthese der viralen mRNA wird von der RNA-Polymerase II im Kern der Wirtszelle durchgeführt. Die mRNAs des HBV haben die typische Struktur einer eukaryontischen RNA. Sie besitzen am variablen 5'-Ende eine Cap-Struktur und haben ein gemeinsames polyadenyliertes 3'-Ende. Alle Transkripte haben weiterhin gemeinsam, dass sie sogenannte posttranskriptionale regulative Elemente (PRE α und β) besitzen (Nukleotide 1151 bis 1684 bei HBV-Subtyp *ad*). Diese Elemente sind in der Funktion dem Rev-responsiblen Element von HIV funktionell homolog (Huang u. Liang, 1993), indem sie als cis-agierende Elemente den Zellkernexport der mRNAs erleichtern und deren Akkumulation im Zytoplasma fördern ohne dass es zum Spleißen kommt (Zang, 1998).

Es lassen sich drei Hauptgruppen von viralen Transkripten unterscheiden (Cattaneo et al., 1983 u. 1984; Standing et al., 1984; Will et al., 1987). Die eine hat eine Länge von 2,1 bis 2,4 Kilobasen (kb) und kodiert für die drei Oberflächenproteine (Abb.1. 2). Eine 2,4 kb lange mRNA kodiert für das LHBs-Protein. Ungefähr 30 Nukleotide stromaufwärts der Cap-Stelle liegt der PräS1-Promotor (Will et al., 1987), der hoch leberspezifisch wirkt. Die MHBs- und SHBs-Proteine werden durch etwas kürzere mRNAs mit zwei verschiedenen Startpunkten kodiert. Je nachdem, ob das Transkriptionsstartsignal oberhalb oder unterhalb des MHBs-Startpunktes benutzt wird, entsteht eine PräS2- bzw. S-mRNA. Die Transkription wird vom PräS2/S-Promotor reguliert, der sich vor dem PräS2-Start befindet und nicht leberspezifisch ist (Pourcel et al., 1982).

Die zweite mRNA-Gruppe ist mit einer Länge von 3,5 kb sogar etwas größer als das virale Genom und wird daher auch als supergenomisch bezeichnet. Sie trägt zum einen die Information zur Synthese der HBc-, HBe-, Polymerase-Proteine (Enders et al., 1985; Yaginuma et al., 1987) und zum anderen stellt sie die RNA-Matrize als Vorläufer des DNA-Genoms für den Replikationszyklus dar (Ganem u. Varmus, 1987). Die Transkription dieser RNAs wird durch Promotoren reguliert, die vor und zwischen den beiden repetitiven Sequenzen DR1 und DR2 lokalisiert sind und vorwiegend leberspezifisch wirken (Rall et al., 1983). Für eine maximale Transkriptionsaktivität sind zudem die beiden Enhancer I (Shaul et al., 1985) und II (Yuh et al., 1992), die zwischen der Region S und dem Beginn der Region C liegen, von Bedeutung. Auch diese beiden Enhancer zeigen eine ausgeprägte Gewebespezifität (Treinin und Laub, 1987; Yuh et al., 1992).

Die kleinste subgenomische RNA ist 0,9 kb groß und kodiert für das HBx-Protein (Kaneko und Miller, 1988). Die Transkription wird durch den HBx-Promotor und den Enhancer I vor dem HBx-Start reguliert (Shaul et al., 1985; Treinin und Laub, 1987).

1.7 Replikation des Hepatitis-B-Genoms

Die eigentliche Vermehrung des Virusgenoms findet im Zellkern durch die Transkription der cccDNA in die pregenomische-RNA mittels der zellulären RNA-Polymerase II statt. Die Umwandlung der prägenomischen-RNA in das reife virale DNA-Genom findet innerhalb des Core-Partikels statt. Dabei spielen die beiden direkten Sequenzwiederholungen (DR1 und DR2) eine entscheidende Rolle. Die Synthese des DNA-Minusstranges beginnt am 3'-Ende des Prägenoms innerhalb der DR1-Sequenz. Die aminoterminal Domäne der HBV-Polymerase dient als Primer zur Initiation der DNA-Synthese (Bartenschlager u. Schaller, 1988). Die HBV-Polymerase hat außerdem eine reverse Transkriptase-Domäne (Summers und Mason, 1982), die das RNA-Prägenom in einen komplementären DNA-Strang umschreibt. Synchron zur Synthese des DNA-Minusstranges wird durch die RNase-H-Domäne der Polymerase das RNA-Prägenom im entstandenen DNA-RNA-Hybrid abgedaut (Radziwill et al., 1990). Dadurch entsteht ein einzelsträngiges DNA-Molekül von negativer Polarität, an dessen 5'-Ende kovalent die Polymerase gebunden ist. Die Synthese des DNA-Plusstranges startet am 3'-Ende der DR2-Sequenz des Minusstranges. Als Primer dient das 18 Basen lange Oligomer, welches am 5'-Ende des RNA-Prägenoms nach dem RNase-H-Verdau übrig bleibt. Eigentlich müsste die Plusstrangsynthese am 5'-Ende des Minusstranges und dem daran gebundenen Protein stoppen, da das 3'-Ende und das 5'-Ende des zuvor synthetisierten Minusstranges noch nicht verknüpft sind. Die terminale Redundanz von 9 Basen an beiden Enden des Minusstranges ermöglicht jedoch ein Fortsetzen der Plusstrangsynthese durch Überwechseln vom 5'-Ende auf diese kurze identische Sequenz nahe des 3'-Endes des Minusstranges. Die Synthese des DNA-Plusstranges wird nicht vollständig durchgeführt, so dass etwa 10-60% des Genoms in HBV-Partikeln einzelsträngig bleiben.

Der Replikationszyklus ist in Abbildung 1.3 dargestellt.

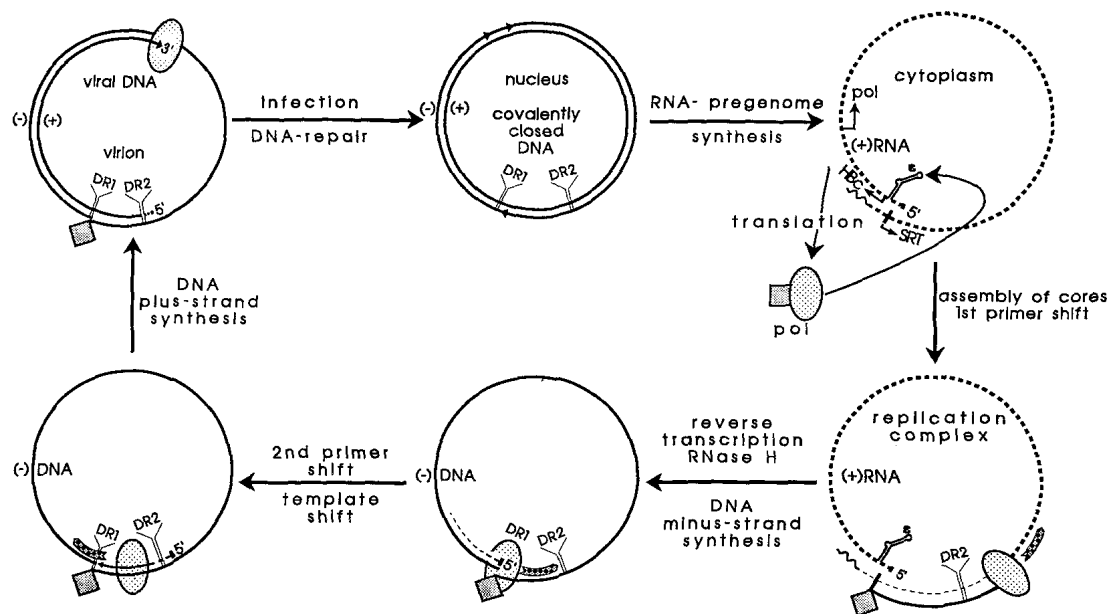


Abb. 1.3 Replikationszyklus des Hepatitis-B-Virus

DR1: direkt repeat 1; DR2: direkt repeat 2; pol: virale Polymerase, weitere Erläuterungen siehe Text (nach Gerlich und Thomssen, 1999).

1.8 Viruskodierte Proteine

In diesem Kapitel werden die von den vier konservierten offenen Leserahmen (Regionen) kodierten Proteine vorgestellt.

1.8.1 Die Region C

Diese Region kodiert für das Protein des viralen Nukleocapsids (HBcAg) und für das HBeAg. HBcAg und HBeAg sind in ihrer Aminosäurezusammensetzung weitgehend identisch, das HBeAg enthält aber noch eine zusätzliche aminoterminaler Signalsequenz, da die Translation des HBeAg am 1. Startcodon beginnt, das oberhalb des 5'-Endes des RNA-Prägenoms liegt und nur in der mRNA für HBeAg vorliegt. Das Startcodon des HBcAg liegt 87 Nukleotide weiter distal in 3'-Richtung. Der 87 Nukleotide lange aminoterminaler Bereich der nur im HBeAg vorliegt wird auch als PreC-Region bezeichnet, während der gemeinsame Abschnitt von HBeAg und HBcAg Core/e-Region genannt wird.

Die Translation des C-Gens führt zur Synthese eines 21-22 kDa Proteins (HBcAg) (Feitelson et al., 1982; Yamaki et al., 1982; Gerlich et al., 1982), von dem 180 oder 240 Moleküle zum Aufbau eines Core-Partikels notwendig sind. (Böttcher et al., 1997; Conway et al., 1997). Diese Moleküle aggregieren zu Nukleocapsidpartikeln und

verpacken unter Vermittlung der endogenen Polymerase dieses Enzym selbst zusammen mit dem RNA-Prägenom (Hirsch et al., 1990; Schlicht et al. 1989). Die 180 bzw. 240 Moleküle bestehen aus 90 bzw. 120 Dimeren. Das Core Protein ist 183 (bzw. 185) Aminosäuren lang und enthält am carboxyterminalen Ende eine Region, die mit der Nukleinsäure interagiert (Conway et al., 1997; Böttcher et al., 1997). In Nukleokapsiden lässt sich außerdem noch eine endogene Kinaseaktivität nachweisen. Die Protein-Kinase phosphoryliert Serin-Reste von Core-Proteinen (Gerlich et al. 1982). Bei der Kinase handelt es sich vermutlich um die zelluläre Protein-Kinase C (Kann u. Gerlich, 1994). Das HBcAg enthält konformationelle Epitope, die in infizierten Personen eine Immunantwort induzieren (Almeida et al., 1971).

Die Expression des gesamten Bereichs (PreC und C/e) führt zur Synthese eines 25 kDa großen HBe-Proteins (HBeAg). Das HBeAg unterscheidet sich in der intrazellulären Verteilung aufgrund der zusätzlichen Signalsequenz vom HBcAg. Das HBeAg wird bereits cotranslational ins Lumen des rauen endoplasmatischen Retikulums eingeschleust, und noch während der Translation werden 19 Aminosäuren durch die zelluläre Signalpeptidase wieder abgespalten (Standring et al., 1988; Bruss u. Gerlich, 1988). Zusätzlich wird das naszierende HBe-Protein in einem zweiten proteolytischen Schritt am Carboxyterminus noch einmal gekürzt, so dass letztlich ein 16-18 kDa großes Protein entsteht (Standring et al., 1988). Anschließend wird das HBeAg als lösliches Protein von der infizierten Leberzelle sezerniert und kann im Serum infizierter Individuen nachgewiesen werden (Magnius u. Espmark, 1972). Das HBeAg ist nicht essentiell für die Virusvermehrung, ist jedoch bei allen Hepadnavirusarten konserviert. Es moduliert die T-Zell Immunantwort, indem es den humoralen Th2-Zweig stärkt, aber die cytotoxische Antwort schwächt (Milich et al., 1999).

1.8.2 Die Region P

Die Region P ist der größte offene Leserahmen und umfasst etwa 80% des gesamten Genoms. Das entstehende Protein von rund 90 kDa ist ein multifunktionales Enzym, mit vier Domänen. Der aminoterminal Bereich entspricht dem Primer-Protein, das am RNA-Prägenom die Synthese des DNA-Minusstranges initiiert (Bartenschlager u. Schaller, 1988; Bosch et al., 1988). Daran schließt sich carboxyterminal ein relativ variabler Bereich an, der als „Abstandhalter“ (Spacer) zwischen dem Primer-Protein und den Domänen mit der Polymerase- und RNase-H-Aktivität dient (Faruqi et al., 1991). Die DNA-Polymerase füllt den Einzelstrang im Genom auf (Kaplan et al., 1973) und die RNase-H verdaut selektiv RNA aus einem DNA/RNA-Hybrid (Radziwill et al.,

1990). Die RNase-H-Domäne wird am Carboxyterminus des Polymerase-Leserahmens kodiert. Außerdem besitzt die P-Region eine Reverse-Transkriptase-Aktivität, die während der Replikation ein RNA-Template zur Synthese des DNA-Minusstranges benutzt (Summer u. Mason, 1982). Die Polymerase muss zur Initiation der Replikation unter Vermittlung zellulärer Faktoren, wie z. B. der Chaperone Hsp 90 und p23 (Hu et al., 1997), an das Verpackungssignal "ε" des RNA-Templates binden (Seeger und Hu, 1997).

1.8.3 Die Region X

Die Region X ist der kleinste offene Leserahmen. Bei HBV umfasst der ORF für das X-Protein 154 Tripletts und kodiert für ein 16-18 kDa großes Protein (Seifer et al., 1990; Gough, 1983). In vitro dient es als Transkriptionsaktivator, der außer den Promotoren des HBV auch viele andere virale und zelluläre Promotoren transaktivieren kann (Aufiero et al., 1990; Zhou et al., 1990; Henkler et al., 1995). Für das HBx-Protein konnte bisher keine DNA-Bindungsdomäne gefunden werden, weshalb das Protein seine Funktion wahrscheinlich über Protein/Proteinwechselwirkungen ausübt (Maguire et al., 1991; Ritter et al., 1991). In Tumorgewebe konnte teilweise eine HBx-Expression nachgewiesen werden (Diamantis et al., 1992; Su et al., 1998).

In vitro konnten Hinweise auf ein onkogenes Potential des HBx gefunden werden (Schaefer et al., 1995). Die Funktion oder Bedeutung von HBx für HBV sind aber unklar (Henkler et al., 1998). Bislang ist nur im Tiermodell des WHV bekannt, dass HBx für die Etablierung der chronischen Infektion benötigt wird (Chen et al., 1993; Zoulim et al., 1994).

1.8.4 Die Region S

Diese Region kodiert für drei Arten von HBs-Proteinen. Der Leserahmen im Genom umfasst je nach HBV-Genotyp 389-400 Tripletts und ist in drei Teile aufgeteilt, die jeweils ein eigenes Startkodon besitzen. Das Stopkodon ist für alle drei Teile gleich. Die ersten 108-119 Tripletts kodieren den PräS1-Bereich, die darauf folgenden 55 Tripletts den PräS2-Bereich und die letzten 226 Kodons repräsentieren den eigentlichen S-Bereich (Heermann et al., 1984). Das S-Gen konnte durch Vergleich der Nukleotidsequenz mit der Aminosäuresequenz als kodierender Bereich der Oberflächenproteine identifiziert werden (Valenzuela et al., 1979; Pasek et al., 1979). Wird bei der Translation das dritte Startkodon des S-Leserahmens benutzt, entsteht das SHBs-Protein (small Hepatitis B surface protein). Dieses Protein kann bis zu einem Anteil von 40% an Asparagin 146 glykosyliert sein, wodurch bei elektrophoretischer

Auftrennung die Banden p 25 (unglykosyliert) und gp 28 (glykosyliert) entstehen (Peterson, 1981). Beginnt die Translation bei dem 55 Tripletts oberhalb des S-Gens liegenden Startkodon, entsteht das MHBs-Protein (middle Hepatitis B surface protein), bei dem 55 Aminosäuren an das SHBs-Protein aminoterminal angefügt werden. Auch hier wird die Aminosäure 146 des SHBs-Proteins partiell glykosyliert, zusätzlich befindet sich im MHBs-Protein noch eine zweite Glykosylierungsstelle an Aminosäure 4, die beim sezernierten HBsAg immer glykosyliert ist. In der Gelelektrophorese zeigen sich daher auch hier zwei Banden, gp33 (einfach glykosyliert) und gp36 (zweifach glykosyliert) (Stibbe u. Gerlich, 1983). Bei Ausnutzung des ersten Startkodons im ORF weitere 108-119 Tripletts oberhalb des MHBs-Startkodons kommt es zur Expression des LHBs-Proteins (large Hepatitis B surface protein). Auch dieses kann an Aminosäure 146 der S-Domäne glykosyliert sein, die Glykosylierungsstelle des MHBs-Proteins an Aminosäure 4 wird aber im LHBs nicht glykosyliert, so dass bei elektrophoretischer Auftrennung eine unglykosylierte und eine glykosylierte Form erkennbar ist (p39 und gp42) (Heermann et al., 1984).

Das SHBs-Protein ist im HBV-Partikel das am häufigsten vorkommende Protein, während das MHBs-Protein in geringster Menge vorhanden ist. LHBs ist häufiger als MHBs in Virionen und Filamenten zu finden, jedoch weniger häufig in Sphären. Es wird vermutet, dass der Expressionsgrad des LHBs auf bisher noch ungeklärte Weise für die Determinierung der Partikelmorphologie verantwortlich ist (Marquardt et al., 1987) und eine Überexpression des LHBs im Vergleich zum SHBs die Sekretion der HBV-Partikel aus der Zelle hinaus verhindert und statt dessen Filamente im endoplasmatischen Retikulum (ER) angereichert werden (Persing et al., 1986; Chisari et al., 1987), da die PräS1-Domäne eine ER-Retentionssequenz enthält (Gallina et al., 1995). Die viralen Hüllproteine werden alle am ER synthetisiert (Gavilanes et al., 1982), modifiziert und über den Golgi-Apparat konstitutiv sekretiert (Patzner et al., 1986).

Das SHBs-Protein enthält im Bereich der Aminosäuren 101-168 weitgehend hydrophile Aminosäuren, die an der Oberfläche der HBs-Partikel exponiert werden und die Antigenität bestimmen. Es sind verschiedene antigene Determinanten innerhalb des HBsAg bekannt, die eine Differenzierung verschiedener Subtypen des HBV erlauben. Diese werden als *d* oder *y* und *w1* bis *w4* oder *r* bezeichnet. Dabei verhalten sich *d* und *y* sowie *r* und *w* wie Allelpaaire, so dass jedes Virus in der Regel neben der bei allen Hepatitis-B-Viren vorhandenen universellen antigenen Determinante *a* zwei Subtypendeterminanten besitzt (Le Bouvier et al., 1972; Bancroft et al., 1972).

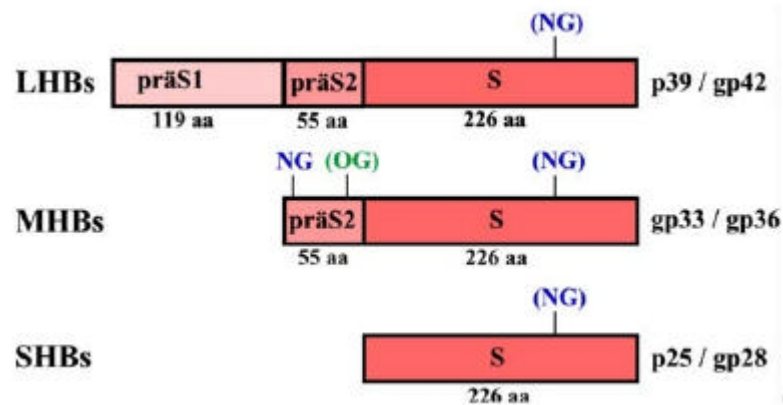


Abb. 1.4 Organisation der Oberflächenproteine von HBV

Schematische Darstellung der Domänenstruktur der HBV-Oberflächenproteine von Genotyp D. Die fakultative N-Glykosylierungsstelle (NG) an Asn 146, die obligate N-Glykosylierungsstelle NG des MHBs an Asn 4, sowie die O-Glykosylierungsstelle (OG) an Thr 37 sind dargestellt. Klammern kennzeichnen partielle Glykosylierung bei Asn 146 des SHBs. (Schmitt et al., 1999)

1.8.4.1 Eigenschaften und Topologie des SHBs-Proteins

Die Sequenz des SHBs besteht aus 226 Aminosäuren und kann in drei hydrophobe und zwei hydrophile Bereiche unterteilt werden, wobei 50-60% des Proteins aus α -Helices bestehen (Guerrero et al., 1988). Auch nach weitgehender Entfernung der Lipidanteile behalten die HBs-Partikel ihren relativ hohen α -helikalen Gehalt bei (Sonveaux et al., 1995). Computergestützte Strukturvorhersagen führen diese α -helikalen Bereiche auf vier hydrophobe Abschnitte innerhalb des Proteins zurück (Berting et al., 1995, siehe Abb. 5). Die Sequenz von Aminosäure 11-29 kann auf der Basis von Strukturvorhersagen eine solche α -helikale Konformation einnehmen. Sie hat die Fähigkeit, in die ER-Membran zu inserieren und bewirkt die Translokation der stromaufwärts gelegenen Sequenzen in das ER-Lumen. Dieser Bereich wird daher als Signal I bezeichnet (Eble et al., 1990). Die zweite hydrophobe α -Helix von Aminosäure 80-98 inseriert ebenfalls in die ER-Membran (Signal II), aber im Gegensatz zu Signal I transloziert sie carboxyterminal gelegene Sequenzen, während die Helix selbst und stromaufwärts gelegene Regionen nicht transloziert werden (Eble et al., 1987). Daraus folgt, dass der hydrophile Sequenzbereich zwischen beiden Helices stets auf der zytoplasmatischen Seite der Partikel bleibt. Nach dem Sprossen der HBs-Partikel in das ER-Lumen verbleibt der Abschnitt somit auf der Innenseite. Diese Hypothese wird durch das Fehlen jeglicher Antikörperbildung gegen B-Zell-Epitope dieser Region unterstützt.

Zwei weitere helikale Bereiche durchziehen vermutlich die Membran (168-186 Helix III; 189-207 Helix IV). Aufgrund ihrer Polarität bilden diese Helices vermutlich Multimere.

Die Helices III und IV sind wahrscheinlich so orientiert, dass Interaktionen zwischen hydrophilen Regionen durch Wasserstoffbrücken-Bindungen stabilisiert werden (Stirk et al., 1992, Berting et al., 1995). Eine fünfte transmembrane Helix wird am Carboxyterminus postuliert (Persson und Argos, 1994). Eine Multimerisierung findet auch zwischen verschiedenen HBs-Untereinheiten statt und ist Voraussetzung für den Sprossungs-Prozeß der HBs-Partikel und des HBV. Verkürzte HBs-Proteine ohne die Signalsequenz I sind nicht mehr in der Lage HBs-Partikel zu bilden und verbleiben am ER, während HBs-Proteine ohne die Signalsequenz II nicht stabil sind (Bruss und Ganem, 1991a).

Die Glykosylierung des SHBs erfolgt an der Stelle 146, an der ein Asparagin mit einem biantennären, komplexen Oligosaccharid verbunden wird (Peterson, 1981; Stibbe u. Gerlich, 1982).

Das SHBs-Protein des HBV ist in der Lage Dimere zu formen, daher können die amphipatischen Helices I, III und IV so angeordnet werden, dass ein hypothetischer Kanal entsteht. Der hypothetische Kanal hat einen Durchmesser von etwa 1,5 nm und könnte möglicherweise als Pore fungieren, die den Durchtritt von Ionen oder sogar Peptidketten ermöglicht (Berting et al., 1995).

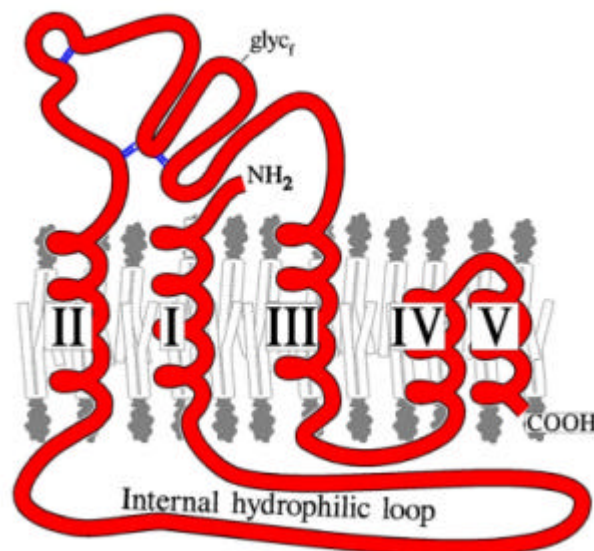


Abb. 1.5 Topologie des SHBs-Proteins. I -V: Transmembranhelices I-V. Die fakultative Glykosylierung an der Position Aminosäure 146 ist gekennzeichnet (N-gly_f). Die HBs-Epitope entstehen durch komplexe Faltung der externen hydrophilen Loops zwischen den α -helikalen Bereichen II und III und werden durch Cysteinbrücken stabilisiert. Weitere Erläuterungen im Text (Bild nach Kann und Gerlich, 1998).

1.8.4.2 Eigenschaften und Topologie des MHBs-Proteins

Das MHBs-Protein setzt sich aus der S-Domäne und der daran angefügten PräS2-Domäne zusammen und besteht aus 281 Aminosäuren. Die PräS2-Region ist an der Oberfläche von Virionen und 20 nm Partikeln exponiert und überdeckt dort die S-Domäne des MHBs-Proteins teilweise. Möglicherweise deswegen zeigt die PräS2-Region in Mäusen eine etwas stärkere Antigenität als die S-Region (Milich, 1985).

Der Bereich der Aminosäuren 5-18 der PräS2-Domäne besitzt eine Bindungsstelle für modifiziertes humanes Serumalbumin (Machida et al., 1984; Krone et al., 1990; Sobotta et al., 2000), die möglicherweise bei der Virusaufnahme in die Zelle eine Rolle spielt. Es konnte gezeigt werden, dass nur Serumalbumin von Menschen oder Schimpansen an humanes MHBs binden kann (Machida et al., 1984). Diese Erkenntnisse sprechen für eine Serumalbumin-vermittelte spezie- und organspezifische Anheftungsstelle des HBV (Thung u. Gerber, 1984). Die Natur der Modifikation des humanen Serumalbumins ist unbekannt, sie kann aber durch in vitro Glutaraldehyd-polymerisiertes Humanserumalbumin imitiert werden (Yu et al., 1985). Andere Erkenntnisse zeigen, dass auch natürliches Humanserumalbumin mit geringer Affinität an den PräS2 Bereich binden kann (Krone et al., 1990).

Das MHBs-Protein enthält an Position Aminosäure 4 ein Asparagin, das mit einem komplexen Glykan verknüpft ist (Stibbe u. Gerlich, 1982). Das MHBs ist entweder nur an dieser Position (gp33) oder zusätzlich im S-Bereich an Position 146 (gp36) glykosiliert (Stibbe u. Gerlich, 1982).

Die 55 Aminosäuren lange PräS2-Domäne ist hydrophil, wobei das N-terminale Methionin zu 90% acetyliert ist (Schmitt et al., 1999). Sie ist sehr sensitiv gegenüber Proteasen und kann selektiv von der S-Region entfernt werden (Heermann et al., 1987). Proteolyse findet durch Trypsin an den Positionen Arginin 47 der PräS2-Sequenz und durch V8-Protease an Position Glutamin 2 der S-Sequenz statt (Stibbe u. Gerlich, 1982). Die Spaltungen haben zur Folge, dass HBs-Partikel unspezifisch an verschiedene Säugerzellen binden können. Vermutlich wird durch die proteolytische Spaltung eine hydrophobe Fusionssequenz freigelegt, die ein Verschmelzen der Virusmembran mit der Zellmembran induziert (Lu et al., 1996). Für die Morphogenese der Virionen *in vitro* (Bruss und Ganem, 1991b) und *in vivo* (Fernholz et al., 1991) ist das MHBs-Protein nicht notwendig. Auch für das Weiterbestehen der Infektion in einem chronisch infizierten HBV-Träger scheint das mittlere Hüllprotein nicht essentiell zu sein (Fernholz et al., 1993).

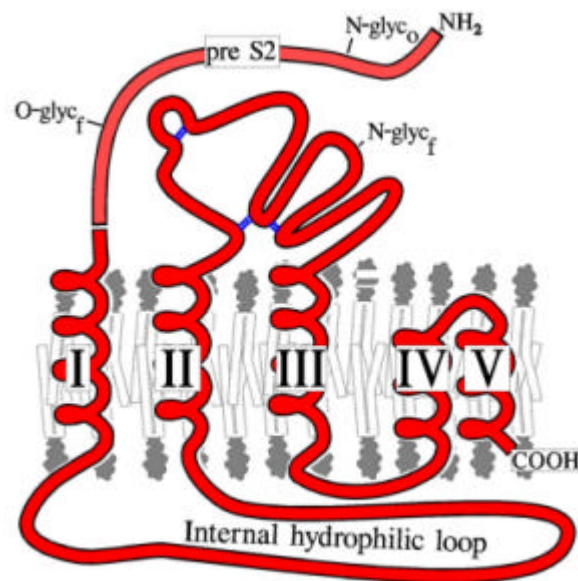


Abb. 1.6 Topologie des MHBs-Proteins. Erläuterungen im Text (Bild nach Kann und Gerlich, 1998)

1.8.4.3 Eigenschaften und Topologie des LHBs-Proteins

Das LHBs-Protein umfasst die Regionen S, PräS2 und PräS1 und besteht aus 389 bzw. 400 Aminosäuren. An Glycin 2 ist das Protein mit einer Myristinsäure acyliert, die möglicherweise als Membrananker dient (Persing et al., 1987). Die Acylierung hat auf die Morphogenese von Virionen keinen Einfluss (Bruss u. Ganem, 1991b), ist aber essentiell für eine Infektion (Gripon et al., 1995; Macrae et al., 1991). In reifen Virionen und HBs-Partikeln sind die PräS-Regionen sowohl für Antikörper (Heermann et al., 1984), für Rezeptoren (Neurath et al., 1992), als auch für Proteasen (Heermann et al., 1987) zugänglich, während die S-Region und kleinere Teile der PräS2-Region von der PräS1-Domäne überdeckt werden.

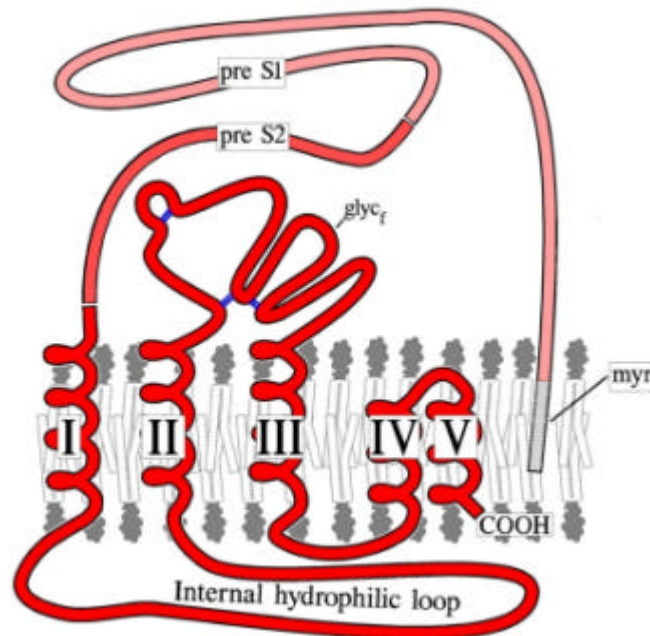
Im Gegensatz zum MHBs ist das LHBs an der Aminosäure 4 der PräS2-Region nicht glykosyliert, was mit dem Biosyntheseweg des Proteins zusammenhängt (Ostapchuck et al., 1994; Bruss et al., 1994; Prange et al., 1995).

Die PräS1-Domäne des LHBs ist zunächst auf der cytosolischen Seite des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert, bei kompletten Viren exponieren aber 50% der LHBs-Moleküle die PräS1-Domäne auf der Hülle der Viren. Da die PräS1-Domäne sehr hydrophil ist, könnte ein hydrophiler Kanal für den Transport der PräS1 Domäne vom Lumen zur Außenseite der Hülle verantwortlich sein (Bruss et al., 1994). Der auf cytosolischer Seite gelegene Teil des LHBs ist für die Retention von HBs-Partikeln verantwortlich (Bruss und Vieluf, 1995) und mit einem Hitzeschockprotein hsc70 assoziiert (Hild, 1995). Die Region der Aminosäuren 20-47 des PräS1-Bereichs

fungiert möglicherweise als Anheftungsstelle des HBV an die Leberzelle (Neurath et al., 1986; Pontisso et al., 1989).

Die PräS1-Region ist eine der variabelsten Bereiche, was darauf hinweist, dass sie am intensivsten dem immunologischen Druck des Wirtes ausgesetzt ist.

A



B

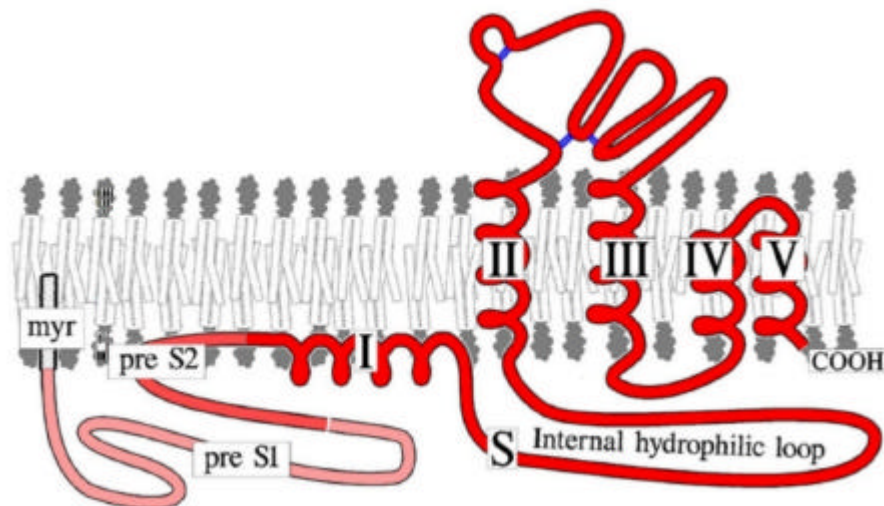


Abb.1.7: Topologie des LHBs-Proteins

A: Das LHBs-Protein mit den PräS-Domänen auf dem Virus lokalisiert. Die Graphik zeigt die proteasesensitive Stelle am Übergang zwischen der PräS2 und S Domäne (nach Lu et al., 1996). myr: Myristinsäure. Weiter Erläuterungen im Text.

B: Das LHBs-Protein mit den PräS-Domänen, wie sie im Inneren des Virus vorliegen könnten. (Bild nach Kann und Gerlich, 1998)

1.9 Besonderheiten der Leberstruktur

Das Prinzip des Leberfeinbaus besteht darin, dass das Pfortaderblut in möglichst breite Berührung mit den Leberzellen gebracht wird, um den Austausch zu vollziehen. Die Pfortader bringt das Blut aus den unpaaren Baueingeweiden in das venöse Wundernetz der Leberkapillaren (Sinusoide), die sich wiederum in einer Vene sammeln.

Die arterielle Versorgung des Lebergewebes erfolgt über die Leberarterie, deren Äste zusammen mit Ästen der Pfortader und den sich aus den Gallenkanälchen rekrutierenden Gallengängen in den Glissonschen Dreiecken zwischen den Leberläppchen verlaufen.

Das Leberläppchen ist die funktionelle architektonische Baueinheit der Leber. Die Leber wird von Millionen derartiger Einheiten aufgebaut, in denen die Leberzellen mauerartig von der Oberfläche gegen das Zentrum des Läppchens geordnet sind, so dass zwischen ihnen die Sinusoide eine Verbindung zwischen den Pfortaderästen an der Oberfläche und der Zentralvene in der Achse des Läppchens herstellen. Die sinusoidale Seite der Leberzelle ist die Versorgungsseite, während die Entsorgungsseite die apikale Membran der Gallenkanälchen ist. Die Gallenkanälchen sind rinnenförmige Einstülpungen der Plasmamembran zweier benachbarter Leberzellen, die mit Mikrovilli besetzt sind und in einiger Entfernung der Gallenkapillare durch Desmosomen gegen den weiteren Interzellularraum abgeschlossen sind. Diese Gallenkapillaren haben also keine eigene Wand, ihre Wand ist die Plasmamembran zweier benachbarter Leberzellen, sie stellt die apikale Seite der Epithelzelle dar (siehe Abb 1.8). Die Gallenkapillaren sind Funktionsstrukturen, d.h. sie bilden sich erst in der Sekretionsphase der Leberzelle aus und verschwinden wieder in der Ruhephase.

Die sinusoidale Seite der Leberzellen ist mit einem Rasen von Mikrovilli bedeckt (siehe Abb 1.8). Das mit Poren versehene Endothel der Sinusoide liegt den Leberzellen nicht direkt an, hier liegt der von Blutplasma durchspülte Dissésche-Raum. Das Blutplasma gelangt durch Spalten zwischen den Endothelzellen, die sogenannten Fenestrae in den Disséschen-Raum. Die Endothelzellen sind in der Lage, Korpuskeln zu phagozytieren und werden deshalb dem retikuloendothelialen System zugerechnet. Sie werden auch als von-Kupffersche Sternzellen bezeichnet. Im Bereich des Interzellularspaltes wird die Plasmamembran als lateral bezeichnet (siehe Abb 1.8).

1.10 Endozytose

Als Endozytose bezeichnet man die Aufnahme von gelösten Stoffen, Partikeln und Flüssigkeit in membrangebundene intrazelluläre Vesikel. Während bei der Phagozytose umfangreiche Partikel wie Mikroorganismen oder Zelltrümmer aufgenommen werden, gelangen durch Pinozytose Flüssigkeiten und gelöste Stoffe in Vesikel, deren Durchmesser bis zu 150 nm betragen kann (Pol et al., 1997). Da zur Phagozytose nur spezialisierte Phagozyten wie z.B. die von-Kupfferschen-Sternzellen in der Leber fähig sind, endozytieren Hepatozyten, wie die meisten anderen Zellen, über Pinozytose Flüssigkeit und gelöste Stoffe aus ihrer direkten Umgebung (Synnes et al., 1999; Watts et al., 1992). Neben einer unspezifischen Endozytose von Flüssigkeiten (Goldstein et al., 1985) werden die meisten Liganden, wie Transferrin, low density Lipoprotein (LDL) oder desialylierte Glykoproteine über Rezeptor-vermittelte Endozytose aufgenommen (Brown et al., 1979; Hanover et al., 1985; Ashwell et al., 1982). Nach der Bindung des Liganden an seinen Rezeptor auf der Plasmamembran induziert dies eine Konformationsänderung des Rezeptors, so daß an den zytosolischen Bereichen des Rezeptors spezielle Adaptorproteine (AP-2) binden (Chang et al., 1993). Durch Aggregation der zytosolisch gebundenen Adaptorproteine kommt es zu einer Anreicherung von Rezeptoren an speziellen Membranbereichen der Zelle. Dies induziert eine Bindung von Clathrinuntereinheiten, die eine gerüstartige Struktur bilden (curved pits; Ungewickell et al., 1981). Durch die Einwirkung von zusätzlichen Faktoren kommt es unter ATP-Verbrauch zu Umlagerungen der Clathrin-Gerüststruktur, die zu einer Invaginierung des Membranbereiches führt (coated pits; Honing et al., 1994), der durch Dynamin unter GTP Hydrolyse abgeschnürt wird (Cremona et al., 1997). Nach der Vesikelbildung (coated vesicle) wird das Clathringerüst durch Auxillin und das Hitzeschockprotein HSC 70 abgebaut (Ungewickell et al., 1995). Das entpackte Vesikel wird durch CLIP-170 an zytoplasmatische Mikrotubuli gebunden (Pierre et al., 1992) und unter Vermittlung des frühen endosomalen Antigen 1 (EEA1) zu einem zentralen Endosomenkomplex transportiert (Patki et al., 1997). Dieser Komplex besteht aus tubulo-vesikulären Strukturen von 70 bis 350 nm Durchmesser. Durch den von vesikulären ATPasen bedingten Protonenimport liegt der pH-Wert in diesen Strukturen bei pH 6,0 bis 5,5 (Warnock, 1999; Ohkuma et al., 1981). Dies vermittelt bei vielen gebundenen Liganden eine Dissoziation von ihrem Rezeptor, weshalb man dieses Kompartiment auch das Kompartiment der Entkopplung von Rezeptor und Ligand nennt (compartment of the uncoupling of receptor-ligand = CURL; Geuze et al., 1983). Während der Rezeptor über das Abschnüren von Recycling-Vesikeln (receptor recycling compartment = RRC)

1.11 Bindung und Aufnahme des Virus

Der Eintritt von umhüllten Viren in ihre Zielzelle erfolgt durch Bindung des Virus an einen oder mehrere Rezeptoren auf der Zellmembran, gefolgt von einer Fusion der viralen Hülle mit der zellulären Membran (Penetration). Nach der Bindung fusionieren einige Virusfamilien, wie die Paramyxoviren, Retroviren und Herpesviren, direkt mit der Plasmamembran. Bei anderen Viren, wie den Alphaviren, Rhabdoviren und Orthomyxoviren, erzeugt eine Bindung an die Plasmamembran der Zelle nicht direkt eine Fusion. Die gebundenen Viren werden zuerst endozytiert und fusionieren später mit der endosomalen Membran (Marsh, 1993).

Der Weg des HBV in die Leberzelle ist noch relativ unbekannt. Erschwert wird die Aufklärung durch das Fehlen eines in vitro Infektionssystems, da primäre humane Hepatozytenzellkulturen nur wenige Tage nach In-Kulturnahme permissiv gegenüber einer HBV-Infektion sind, die außerdem noch sehr ineffizient verläuft (Galle et al., 1994; Hagelstein et al., 1997). Alle bekannten humanen Hepatomzelllinien sind unter nativen Bedingungen für eine HBV-Infektion nicht suszeptibel. HepG2-Zellen sind zwar in der Lage HBV-Partikel und Sphären aufzunehmen, doch nur sehr ineffizient (Treichel et al., 1994; Qiao et al., 1994). Permanente Leber- und andere Zelllinien sind in der Lage nach Transfektion mit klonierten HBV Genomen eine Replikation zu gestatten und HBs- und HBeAg in das Zellkulturmedium zu sezernieren (Sureau et al., 1986; Sells et al., 1987; Seifer et al., 1990). Somit scheint ein wichtiger Teilschritt zwischen Aufnahme und Genomtransport im Zellkultursystem zu fehlen. Trotz dieser Komplikationen wurde eine Reihe von Bindungspartnern beschrieben (siehe auch Tabelle 1.3), deren Bedeutung im viralen Lebenszyklus jedoch noch ungeklärt bleibt. Pontisso et al. (1992) und Neurath et al. (1986 und 1992) konnten die Bedeutung der PräS1-Region für die Bindung an Lebermembranen und deren Kompetition mit anti-PräS1-Antikörpern zeigen. Darüberhinaus wurden der Asialoglycoproteinrezeptor (AsGPR) als Bindungspartner des PräS1-Glykans beschrieben (Treichel et al., 1994), sowie die an Aminosäure 21-42 bindenden Faktoren Interleukin 6 (IL-6) (Neurath et al., 1992), HBV-bindender Faktor (HBV-BF) (Budkowska et al., 1993 und 1997) und 31 kDa Protein (Dash et al., 1992). Ebenfalls als Bindungspartner des PräS1 (Aminosäure 12-53) wurde die Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase (Petit et al., 1992) diskutiert.

Die PräS-Domäne bestimmt den Wirtstropismus bei aviären Hepatitisviren (Kuroki et al., 1995). Die Carboxypeptidase D (gp180), ein transmembranes Protein, fungiert bei aviären Hepatitisviren als primärer zellulärer Rezeptor. Das gp180 ist größtenteils innerhalb der Zelle im Golgi-Apparat lokalisiert und nur zum geringen Teil an der

Zelloberfläche. Es bindet das DHBV im Bereich der Aminosäuren 30-115 des präS (Breiner et al., 1998). Für diese Bindung ist vor allem die 3D-Struktur dieser Sequenz von Bedeutung (Urban et al., 1998). Das gebundene DHBV wird mit dem gp180 internalisiert, was auf eine endozytotische Aufnahme hinweist (Breiner et al., 1998; Breiner et al., 1999). Ein saurer pH-Wert ist für die Infektion aber nicht von Bedeutung (Rick et al. 1992), der Viruseintritt ist aber energieabhängig (Köck et al., 1996). Vermutlich ist für die Infektion ein zweiter spezie-spezifischer Rezeptor notwendig. Ein möglicher Korezeptor für das DHBV ist die Glycin-Decarboxylase (p120) (Li et al., 1996).

Für das Haupthüllprotein (SHBs) des HBV sind einige Bindungspartner identifiziert worden. Dies sind Apolipoprotein H (Mehdi et al., 1994), das über LDL-Partikel eine Aufnahme über den LDL-Rezeptor ermöglichen könnte und weiterhin Annexin V (früher als Endonexin II bezeichnet) (De Bruin et al., 1994; Hertogs et al., 1994; De Meyer et al., 1997; Gong et al., 1999), das als Phospholipid-bindendes Protein eine Verbindung zu der Hepatozytenmembran herstellen könnte. Das MHBs-Protein scheint hingegen für eine Infektion relativ unbedeutend zu sein (Fernholz et al., 1993; Sureau und Lanford, 1993). Trotz der nicht essentiellen Funktion der PräS2-Domäne könnte diese eine Hilfsfunktion bei der Bindung des Virus haben. Die PräS2-Domäne besitzt eine Bindungsstelle für modifiziertes humanes Serumalbumin (HSA) (Machida et al., 1984; Krone et al., 1990; Pontisso et al., 1989), die möglicherweise bei der Virusaufnahme in die Zelle eine Rolle spielt. Hepatozyten haben eine Serumalbumin-Bindungsstelle (Trevisan et al., 1988), die spezie-spezifisch ist (Machida et al., 1984). Viren könnten daher über die Bindung von monomerem und polymerisiertem humanen Serumalbumin eine verstärkte Bindung an Leberzellmembranen erreichen. Ein weiterer Grund für die Bindung von HSA an die PräS2-Domäne könnte die Maskierung wichtiger B-Zell-Epitope sein (Sobotta et al., 2000). Außerdem könnte die Zirkulationsfähigkeit des Virus und der HBsAg-Partikel durch die Bindung von HSA im Blutkreislauf verbessert sein. Fibronektin ist ein zusätzlicher Ligand für die PräS2-Domäne (Budkowska et al., 1995) und auch der Transferrin-Rezeptor bindet an die PräS2-Domäne (Gagliardi et al., 1994).

Tab 1.3 Beschriebene Bindungspartner

	REGION	BINDUNGSPARTNER
HBV	PräS1 21-47	HBV bindender Faktor (HBV-BF) (Budkowska et al., 1993 und 1997)
	PräS1 21-47	Zellgebundenes IL-6 (Neurath et al., 1992)
	PräS1 21-47	31 kDa Protein (Dash et al., 1992)
	PräS1 23-47	IgA Rezeptor (Pontisso et al., 1992)
	PräS1 12-53	Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase (Petit et al., 1992)
	PräS1	Asialoglykoproteinrezeptor (Treichel et al., 1994)
	PräS1 12-20 und 82-90	80 kDa Protein (Ryu et al., 1999)
	PräS2 135-145	Transferrin Rezeptor (Gagliardi et al., 1994)
	PräS2 130-150	modifiziertes/natives Humanserumalbumin (Machida et al., 1983; Pontisso et al., 1989 ; Krone et al., 1990)
	PräS2 120-145	Fibronektin (Budkowska et al., 1995)
	SHBs	Apolipoprotein H (Mehdi et al., 1994 und 1996)
DHBV	SHBs	Annexin V [Endonexin II] (Hertogs et al., 1994; De Bruin et al., 1994; De Meyer et al., 1997; Gong et al., 1999)
	PräS 30-115	Carboxypeptidase D (gp180) (Kuroki et al., 1995; Breiner et al., 1998)
	PräS 98-102	Glycin Decarboxylase (p120) (Li et al., 1996)

1.12 Virale Fusionsproteine und ihre Aktivierung

Der Eintritt membranumhüllter Viren in die Zelle erfordert häufig eine proteolytische Spaltung der Oberflächenproteine der Viren in der Nähe einer Fusionsdomäne, welche die Fusion mit einer zellulären Membran ermöglicht (Nagai, 1993). Ein Fusionsprotein wird zunächst als inaktives Protein synthetisiert und danach in der Regel während der Reifung durch Proteasen aktiviert (Klenk und Garten, 1994). Diese Aktivierung kann aber alternativ auch beim Eintritt der Virionen in eine Zielzelle geschehen. Durch diese proteolytische Aktivierung kommt es bei vielen Virusfamilien (z.B. Orthomyxo-, Paramyxo- und Retroviren) zur Freisetzung eines aminoterminalen Fusionspeptids. Durch ein solches Fusionspeptid wird der erste Prozess der viralen und zellulären Membranverschmelzung eingeleitet. Es können prinzipiell zwei Wege beschritten werden. Einerseits kann es zu einer rezeptor-vermittelten Endozytose kommen, bei der die Verschmelzung der beiden Membranen erst in der endosomalen Membran erfolgt (z.B. Influenzaviren) oder andererseits kann die Verschmelzung nach Rezeptor und/oder Korezeptorbindung schon an der Plasmamembran geschehen (z.B. HIV-Virus oder Masernvirus) (Dimitrov et al., 1997).

Über den viralen Penetrationsmechanismus von HBV ist noch wenig bekannt. Für ein Tiermodell des Hepatitis-B-Virus, das Duck-Hepatitis-B-Virus (DHBV) wurde gezeigt, dass die Freisetzung des Kapsids im endosomalen Kompartiment erfolgt (Köck et al., 1996, Breiner et al., 1998).

Bei HBV ist möglicherweise eine Proteolyse beteiligt. Die PräS₂-Domäne ist sehr anfällig für proteolytische Spaltung und kann selektiv von der S-Domäne entfernt werden (Heermann et al., 1987). In vitro zugängliche Spaltstellen sind Arginin 16, 18 und 48 und Glutamin 2 in der S-Domäne. Nach proteolytischer Spaltung durch HBV-BF (HBV-binding factor), der eine Metalloproteinase sein soll, an Position R18 konnte eine geringe Aufnahme von HBV in Lymphozyten festgestellt werden (Budkowska et al., 1997). Behandelt man HBV mit V8 Protease so lässt sich eine schwache Internalisierung von Virionen in HepG2-Zellen nachweisen (Lu et al., 1996).

Die V8-Protease, eine Serin-Endoproteinase von *Staphylococcus aureus* (Drapeau et al., 1972), ist in der Lage die Hüllproteine des Hepatitis-B-Virus zu spalten. Sie schneidet nach negativ geladenen Aminosäuren wie Glutaminsäure oder Asparaginsäure, aber auch nach Alanin und Phenylalanin, jedoch sehr ineffizient (Breddan und Meldal, 1992). Durch die Behandlung von HBsAg mit V8-Protease werden die PräS-Bereiche der M und L-Proteine gespalten, während das S-Protein erhalten bleibt. Eine der Spaltstellen der V8-Protease ist die Glutaminsäure 2 am Aminoende der S-Domäne. Nur wenige Aminosäuren weiter carboxyterminal am

Aminoende der S-Domäne befindet sich eine Sequenz, welche möglicherweise als Fusionssequenz fungiert (siehe Abb. 1.9).

Da für das Hepatitis-B-Virus bisher kein leicht zugängliches System existiert um die Fusion zu untersuchen, nutzten Berting et al. (2000) das gut charakterisierte Fusionssystem des Influenza-A-Virus-Hämagglutinin (HA). Das HA hat im HA1 Fragment eine Bindungsstelle für Sialinsäure, welche als Rezeptor für das Virus an der Zelloberfläche dient. Nach der Rezeptorbindung wird das Virus endozytiert. Die aminoterminalen Fusionssequenz des HA2 Fragments ändert durch die Ansäuerung in den Endosomenvesikeln seine Konformation. Dadurch gelangt das Fusionspeptid in unmittelbare Nähe der Endosomenmembran, wird dort eingelagert und induziert die Verschmelzung der beiden Lipiddoppelschichten (Bullough et al., 1994). Um die putative HBV Fusionssequenz zu untersuchen wurde die Influenza Fusionssequenz durch die HBV Fusionssequenz ersetzt. Es zeigte sich, dass die eingesetzte Sequenz als Fusionspeptid wirken kann und den ersten Kontakt zur Zielmembran herstellt. Darüberhinaus binden 25er-Peptide dieser Fusionssequenz Liposomen und sind hämolytisch aktiv (Rodriguez-Crespo et al., 1995).

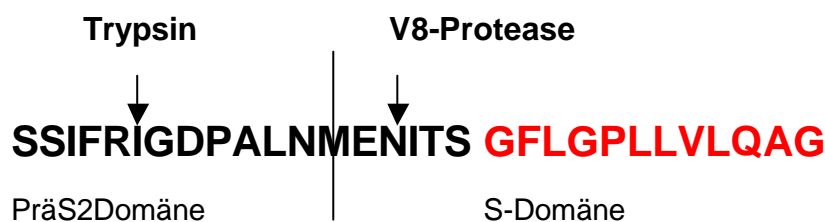


Abb. 1.9 HBV-Sequenz am Übergang zwischen PräS2- und S-Domäne. Pfeile deuten die Schnittstellen der gezeigten Proteasen an. Das putative HBV-Fusionspeptid ist in rot dargestellt.

Für die Fusion muss die Fusionssequenz frei am Aminoende vorliegen, daher wäre für HBV eine Spaltung am Übergang zwischen der PräS2-Domäne und der S-Domäne notwendig.

1.13 Ansätze und Ziele dieser Arbeit

Um die Lokalisation der möglicherweise am Fusionsprozess beteiligten Kompartimente der Leberzelle festzustellen, sollte die proteolytische Wirksamkeit der einzelnen Kompartimente gegenüber HBsAg untersucht werden. Dazu sollten Leberzellen im Zonal-Dichtegradienten subzellulär fraktioniert werden. Anschließend sollten die subzellulären Fraktionen anhand der Dichte und der Leitenzyme identifiziert werden. Die einzelnen Fraktionen sollten dann mit hochgereinigten HBsAg-Filamenten auf ihre proteolytische Aktivität in Bezug auf HBsAg geprüft werden.

Als Ausgangsmaterial sollte eingesetzt werden: porcine Leber (leicht frisch zu beschaffen, als Modell für frische humane Leber), humane Leber (als Zielorgan des Virus) und HepG2-Zellen (permanente humane Leberzellen, die unter nativen Bedingungen nicht mit HBV infizierbar sind). Diese verschiedenen Ausgangsmaterialien sollten Aufschluss geben über die Bedeutung der Zelldifferenzierung (primäre Leberzellen sind hochdifferenziert, permanente Leberzellen stark dedifferenziert) und der Spezies-Spezifität (Mensch, Schwein) bezüglich eines proteolytischen Schnittes bei der Fusion des Virus.

Außerdem sollte geprüft werden welche Domänen des HBsAg gespalten werden. Dazu wurde die Wirkung der Proteasen auf die drei Hüllproteine in SHBs-, MHBs- und LHBs-spezifischen ELISAs festgestellt. Ergänzend dazu wurden Westernblots mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern durchgeführt.

Der Vergleich verschiedener subzellulärer Fraktionen und Extrakte verschiedener Ausgangszellen sollte neben dem Spaltmuster im Westernblot die Spaltgeschwindigkeit, das optimale Konzentrationsverhältnis zwischen Filamenten und subzellulärer Fraktion und die pH-Abhängigkeit beinhalten. Die an der Spaltung beteiligten Proteaseklassen sollten durch Ermittlung der Spaltstellen im Western Blot sowie mit Hilfe von Protease-Inhibitoren bestimmt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Die meisten Chemikalien wurden in der Qualität „reinst“ oder „für die Molekularbiologie“, wenn auf Abwesenheit von RNasen und DNasen geprüft wurde, von der Firma Sigma, Deisenhofen, bezogen. Auf anderswo erworbene Produkte wird im Text hingewiesen

2.2 Puffer und Stammlösungen

Alle Lösungen wurden mit Wasser aus der Reinstwasseranlage (Ionenaustauscher, Millipore, Eschborn) des Instituts angesetzt.

2.2.1 Puffer

Ringerlösung:	140	mM	NaCl
	5	mM	KCl
	2	mM	CaCl ₂
	1	mM	MgCl ₂
	20	mM	HEPES, pH 7,4
PBS-Puffer:	170	mM	NaCl
	3,4	mM	KCl
	10	mM	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
	1,8	mM	KH ₂ PO ₄
	pH 7,4		
ELISA-Beschichtungspuffer (NaPP):	183	mM	NaCl
	8,6	mM	Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O
	2,2	mM	KH ₂ PO ₄
	pH 7,4		
Natriumcitrat-Puffer	100	mM	C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ x 2H ₂ O
Hepes-Puffer	Sigma cell culture, steril		
TNE	20	mM	Tris-HCl pH 7,4
	140	mM	NaCl
	1	mM	EDTA
2.2.2 Lösungen zur SDS-Gelelektrophorese			
Acrylamidlösung:	30	%	Acrylamid
	0,8	%	Bisacrylamid

Laufpuffer 10 x:	0,25	M	Tris-HCl	pH 8,3
	1,92	M	Glycin	
	1	%	SDS	
Trenngelpuffer 4 x:	1,5	M	Tris-HCl	pH 8,8
	0,1	%	SDS	
Sammelgelpuffer 4 x:	0,5	M	Tris-HCl	pH 6,8
	0,4	%	SDS	
Probenpuffer 4 x:	0,25	M	Tris-HCl	pH 6,8
	12	%	SDS	
	13	%	Glycerin	
	20	%	DTT (Serva, Heidelberg)	
	1	%	Bromphenolblau (Serva, Heidelberg)	
	20	%	β -Mercaptoethanol	

2.2.3 Lösungen zur Silberfärbung

Reducer: 50 mg Citronensäure
0,7 ml 37 % Formalin
in 1 l H₂O lösen.

Silbernitratlösung:

Lösung A: 1,55 g AgNO₃
in 8 ml H₂O lösen

Lösung B: 38,2 ml H₂O
3,8 ml NaOH 1 M
2,8 ml 25 % Ammoniak

Lösung A langsam in Lösung B einträufeln. Mit H₂O auf 200 ml auffüllen.

2.2.4 Blot-Transferpuffer: 5,8 g Tris
2,9 g Glycin
1,85 ml 10%ige SDS-Lösung (w/v)
200 ml Methanol
in 1 l H₂O lösen

2.2.5 Chemilumineszenz Substrat (ECL):

225 ml H₂O
25 ml Tris HCl 1 M
1250 μ l Luminol 0,5 M (3 Aminophthalhydrazid)
555 μ l p-Cumarsäure 0,18 M
(4-Hydroxycinnamic acid)

Zur Verdrängung des O₂ wurde die Lösung mit flüssigen N₂ versetzt.
Kurz vor Gebrauch H₂O₂ 1: 10000 (vol/vol) zugeben.

2.2.6 Zellkulturmedium: DULBECCO'S MEM, Nutrient Mix, F12 (1:1)
w/L-Glutamine; w/o NaHCO₃ ; with Pyridoxine
GIBCO BRL
+ 2,438 g NaHCO₃ / l

2.3 Antikörper

2.3.1 Primäre monoklonale Antikörper

Anti-S 1-9C1

affinitätsgereinigter Antikörper aus Hybridomaüberstand, der konformationsunabhängig die Aminosäuresequenz 119-123 des kleinen Hüllproteins erkennt (Sobotta et al., 2000).

Anti-S C20-2

affinitätsgereinigter Antikörper aus Hybridomaüberstand, der konformationsabhängig die Aminosäuresequenz 120-160 des kleinen Hüllproteins erkennt. Er reagiert nur mit der gruppenspezifischen konformationellen Determinante *a* (persönliche Mitteilung Gerlich).

Anti-PreS2 2-11B1

affinitätsgereinigter Antikörper aus Hybridomaüberstand, der konformationsunabhängig die Aminosäuresequenz 5-12 des mittleren Hüllproteins erkennt (Sobotta et al., 2000).

Anti-PreS2 2-12F2

affinitätsgereinigter Antikörper aus Hybridomaüberstand, der konformationsunabhängig die Aminosäuresequenz 18-24 des mittleren Hüllproteins erkennt (Sobotta et al., 2000).

Anti-PreS2 1-9D1

affinitätsgereinigter Antikörper aus Hybridomaüberstand, der konformationsunabhängig die Aminosäuresequenz 35-45 des mittleren Hüllproteins erkennt (Sobotta et al., 2000).

Anti-PreS2 S26

Antikörper aus Ascites, der konformationsunabhängig die Aminosäuresequenz 13-16 des mittleren Hüllproteins erkennt (Sominskaya et al., 1992). Der Antikörper wurde freundlicherweise von Herrn Dr. P. Pumpens (Biochemisches Institut Riga) zur Verfügung gestellt.

Anti-PreS1 MA 18-7

affinitätsgereinigter Antikörper aus Hybridomaüberstand, der konformationsunabhängig die Aminosäuresequenz 31-34 des großen Hüllproteins erkennt.

Die Antikörper wurden zum Teil affinitätsgereinigt, zum Teil als Hybridom-Überstand eingesetzt.

2.3.2 Sekundäre Antikörper

Anti-HBs Peroxydase Konjugat

affinitätsgereinigter Antikörper aus Ziegenserum (Chiron Behring GmbH & Co)

Der Antikörper wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Knapp (Chiron Behring GmbH & Co) zur Verfügung gestellt.

Anti-Mouse-IgG Peroxydase Konjugat

affinitätsgereinigter Antikörper aus Eselserum (Dianova, Hamburg)

Anti-Mouse-IgG (ab')-Alkalische Phosphatase Konjugat

affinitätsgereinigter Antikörper aus Schafserum (Hoffmann-La Roche)

2.4 Zellkultur

Alle Arbeiten mit eukaryonten Zellen erfolgten unter einer Sterilbank. Die Zellmedien und Puffer wurden mit Wasser aus der Reinstwasseranlage der Firma Millipore angesetzt und sterilfiltriert oder autoklaviert.

HepG2 (Aden et al., 1979)

Diese Zellen wurden aus dem Biopsiematerial eines primären humanen Leberkarzinoms isoliert. Es handelt sich um Parenchymzellen, die HBV-DNA frei sind (ATCC, American Type Culture Collection).

Auftauen und Anzucht von Zellen

Alle Zellen wurden aliquotiert über flüssigem Stickstoff bei ca. -170°C in Kryogefäßen der Firma Nalgene gelagert. Aufgetaut wurden die Zellen in vorgewärmtem Medium (Dulbecco's MEM siehe 2.2.6). Das Einfriermedium wurde entfernt, indem die Zellen für 5 min bei 1800 rpm in der Zentrifuge CR 422 (Firma Jouan) pelletiert wurden. Darauf wurden die Zellen in 10 ml Medium (10% FKS, PAN Systems, Aidenbach) resuspendiert und auf einer 10 cm Gewebekulturschale ausplattiert. Die Zellplatten wurden im Brutschrank bei 37°C, 90% relativer Luftfeuchte und 5% CO₂ inkubiert. Mediumwechsel erfolgt in der Regel alle 23 Tage bis die Zellen einen konfluenten Monolayer gewachsen waren. Zur weiteren Vermehrung der Zellen, wurde eine konfluente Zellplatte für 5 min mit Trypsin/PBS-Lösung im Brutschrank inkubiert. Die Enzymlösung wurde abgesaugt und die Zellen mit 10 ml Medium vollständig von der Gewebekulturschale gespült und aufgenommen. Die Zellsuspensionen konnten nun auf drei oder vier Zellplatten verteilt und das fehlende Medium mit 10% FKS ergänzt werden.

2.5 Leberproben

Humanes Lebergewebe stammte aus der chirurgischen Klinik Gießen aus der Abteilung von Prof. Padberg. Die Entnahme des Gewebes wurde von der Ethikkommission der JLU Gießen genehmigt (Antrag 27/99).

Schweineleber wurde vom Städtischen Schlachthof Gießen direkt nach Schlachtung entnommen und von dort sofort geholt und weiterverarbeitet.

2.6 Plasma als Quelle von HBsAg

Zur Reinigung von HBsAg wurde Plasma eines chronischen asymptomatischen Hepatitis-B-Virusträger verwendet. Das Plasma war HBeAg und HBsAg positiv. Das durch Plasmaphorese gewonnene Plasma wurde über mehrere Jahre bei -70°C aufbewahrt. Laut DNA-Sequenzierung der LHBs-Region, die von Dr. Andreas Berting durchgeführt wurde, handelte es sich um HBV Genotyp D, beziehungsweise HBsAg-Serotyp ayw2 mit hoher Ähnlichkeit zum osteuropäischen HBV-Isolat, das von Bichko und Mitarbeitern beschrieben wurde (Bichko et al. 1985).

Das HBV-Trägerplasma wurde freundlicherweise von Herrn Dr. G. Caspari zur Verfügung gestellt.

2.7 Aufreinigung von Viren, Filamenten und Sphären durch Dichtegradientenzentrifugation

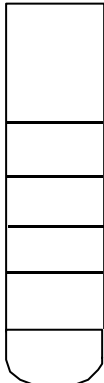
Viren, Filamente und Sphären bandieren im Saccharosegradienten bei unterschiedlichen Dichten und lassen sich daher durch Austropfen des Gradienten in einzelne Fraktionen voneinander trennen.

2.7.1 Erster Reinigungsschritt: Trennung von Viren, Filamenten und Sphären

Das Plasma mußte zunächst vorgeklärt werden, um grobe Partikel zu entfernen. Dazu wurde in 50 ml Falcon Röhrchen 15 min bei 3000 rpm zentrifugiert (Jouan Zentrifuge CR 4 77) und der Überstand abgenommen.

Jeweils maximal 18 ml Überstand konnten auf einen diskontinuierlichen Saccharosegradient von 60-15 % (w/w) in TNE geschichtet werden.

Der Gradient hatte folgende Abstufungen:

Dichte ml		
	Probe ca. 18 ml	38,5 ml (25 x 89 mm) Ultrazentrifugenröhrchen (Polyallomer; Kontron Instruments). Sie wurden mit Sigmacote (Sigma, Deisenhofen) siliconisiert und luftgetrocknet.
	15 % 5 ml	
	25 % 5 ml	
	35 % 4 ml	
	45 % 4 ml	
	60 % 2 ml	

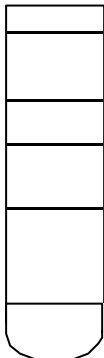
Die Zentrifugation erfolgte in einem TST 28.38 Schwingbecherrotor bei 10°C und 25000 rpm über 15 h in der Ultrazentrifuge (Beckmann; Model L5-50). Nach dem Lauf wurde eine Kanüle in den Gradienten eingeführt und der Gradient von unten nach oben mit Hilfe einer Schlauchpumpe (Masterflex easy-load model 7518-00) ausgepumpt und manuell in 1-1,5 ml Fraktionen innerhalb von 25-30 min. aufgeteilt. Der Saccharosegehalt der einzelnen Fraktionen wurde refraktometrisch ermittelt (Refraktometer; Carl Zeiss).

In geeigneter Verdünnung (optische Dichte (OD) < 2) wurde die Extinktion der Fraktionen im Photometer (Du 70 Spectrophotometer; Beckmann) bei einer Wellenlänge von 280 nm und einer Schichtdicke von $d = 1$ cm bestimmt.

2.7.2 Zweiter Reinigungsschritt: Abtrennung von Fremdprotein von Filamenten

Die Fraktionen des ersten Reinigungsschrittes, die Filamente enthielten, wurden nun weiter aufgereinigt. Dieser Reinigungsschritt wurde in einem diskontinuierlichen Cäsiumchloridgradient der Dichte 1,35-1,16 durchgeführt. Die Fraktionen der ersten Reinigung wurden zunächst vereinigt und anschließend mit Cäsiumchlorid auf eine Dichte von 1,30-1,32 in TNE eingestellt. In diesem Gradienten wurde die Probe im Gegensatz zum Saccharosegradienten nicht sedimentiert, sondern flottiert. Pro Gradient konnten max. 13 ml Probe eingesetzt werden.

Der Gradient hatte folgende Abstufungen:

Dichte ml		
	TNE	38,5 ml (25 x 89 mm) Ultrazentrifugenröhrchen
	1,16 7 ml	(Polyallomer; Kontron Instruments).
	1,24 6 ml	Sie wurden mit Sigmacote (Sigma, Deisenhofen)
	1,27 6 ml	silikonisiert und luftgetrocknet.
	Probe max. 13 ml	
	1,35 4 ml	

Die Zentrifugation erfolgte in einem TST 28.38 Schwingbecherrotor bei 10°C und 25000 rpm über 36 h in der Ultrazentrifuge (Beckmann; Model L5-50). Nach dem Lauf wurden die Fraktionen wie unter 2.7.1 beschrieben ausgetropft.

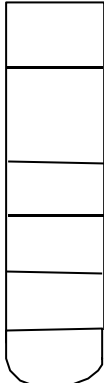
Die Dichte der einzelnen Fraktionen wurde durch Wiegen von 1 ml Probe bestimmt.

Die OD₂₈₀ wurde wie in 2.7.1. beschrieben bestimmt.

2.7.3 Dritter Reinigungsschritt: Abtrennung von Restprotein von Filamenten

Die filamenthaltigen Proben aus der zweiten Reinigung, wurden vereinigt und das CsCl der Probe durch Ultrafiltration entfernt. Die Probe wurde dann auf einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten von 60%-5% (w/w) in TNE geschichtet. Pro

Gradient wurden maximal 9 ml Probe aufgetragen.

	Dichte	ml	
	Probe	ca. 9 ml	38,5 ml (25 x 89 mm)
	5 %	5 ml	Ultrazentrifugenröhrchen (Polyallomer;
	10 %	5 ml	Kontron Instruments). Sie wurden mit
	15 %	5 ml	Sigmacote (Sigma, Deisenhofen) siliconisiert und
	20 %	5 ml	luftgetrocknet.
	25 %	5 ml	
	60 %	3 ml	

Die Zentrifugation erfolgte in einem TST 28.38 Schwingbecherrotor bei 10°C und 25000 rpm über 15 h in der Ultrazentrifuge (Beckmann; Model L5-50). Nach dem Lauf wurden die Fraktionen wie unter 2.7.1 beschrieben ausgetropft. Der Saccharosegehalt der einzelnen Fraktionen wurde refraktometrisch ermittelt (Refraktometer; Carl Zeiss). Die OD₂₈₀ wurde wie in 2.7.1. beschrieben bestimmt.

2.7.4 Anreicherung der Partikel durch Ultrafiltration

Die filamentreichen Fraktionen aus dem zweiten Saccharosegradienten wurden jeweils vereinigt und einer Ultrafiltration unterzogen. Hierfür wurden die Filter (Omegasep-100, Pall Filtron) zunächst mit 15 ml TNE gespült (Zentrifugation bei 4.000 g, 35 min bei 10°C, Jouan Zentrifuge CR 4 77), dann wurde die Probe unter gleichen Bedingungen ultrafiltriert. Danach wurde das Retentat noch dreimal mit TNE gewaschen und die gereinigte, entsalzte und konzentrierte Probe durch Rückzentrifugation erhalten. Von den Proben wurde photometrisch der HBsAg-Gehalt mit der Formel OD₂₈₀ : 4,3 = mg/ml HBsAg (Gerlich und Thomssen, 1975) bestimmt.

2.8 Elektronenmikroskopie

Zur Abbildung im Transmissionselektronenmikroskop (EM) wurde Probenmaterial auf Trägernetze („grids“) aufgetragen und durch Negativkontrastierung mit Uranylacetat sichtbar gemacht (Rohde et al., 1979). Verwendet wurden Kohle-bedampfte Kupfernetze (Plano; 400 mesh, Durchmesser 3mm; W.Plannet GmbH, Wetzlar). Zur Herstellung der Präparate wurden 15 µl gereinigte Virionen oder HBsAg in TNE auf das Netz aufgegeben, 1 min bei Raumtemperatur inkubiert, mit einem Filterpapier abgesaugt und zum Waschen 1 min mit 15 µl TNE-Puffer behandelt. Anschließend erfolgte die Kontrastierung des Materials 1 min mit 10 µl einer 2% -igen (w/v) gefilterten

Uranylacetatlösung. Nach dem Waschen und der Kontrastierung wurde anhaftende Flüssigkeit ebenfalls mit einem Filterpapier von den Netzchen abgesaugt. Die kontrastierten Netzchen wurden luftgetrocknet und bis zur Durchsicht im EM in einer Präparatebox aufbewahrt.

Die Netzchen mit den Proben wurden von Dr. Bruce Boschek in einem Elektronenmikroskop vom Typ EM-10 (Carl Zeiss, Oberkochen) bei Vergrößerungen von 130.000 : 1 untersucht.

2.9 Homogenisierung von Leberzellen

2.9.1 Homogenisieren von Leberstücken aus Schwein und Mensch

Die frische Leber (human bzw. porcin) wurde auf Eis in kleine Stücke zerteilt, in 25 mM Hepes aufgenommen und im Desintegrator (Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel IKA Labortechnik) mit 8000-24000 Umdrehungen/min. 5x 10 sec. homogenisiert. Wurde tiefgefrorene Leber (bei -70°C gelagert) verwendet, wurden die Leberstücke unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff gemörsert, in 25 mM Hepes aufgenommen und anschließend entweder im Desintegrator oder im Dounce Homogenisator homogenisiert.

2.9.2 Homogenisieren von Leberzellen aus Zellkultur

Für die Untersuchung von Proteasen aus Leberzellkultur wurde die Zelllinie HepG2 verwendet. Die Zellen wurden wie unter 2.4. beschrieben gehalten. Es wurden Maxi-Platten (Kulturfläche 143,07 cm², Falcon) mit einem konfluenten Zellrasen verwendet. Zunächst wurde das Medium abgezogen und anschließend die Zellen mit PBS (siehe 2.2.1) gewaschen. Danach wurde der konfluente Zellrasen mit einem Zellschaber von der Platte abgekratzt und in PBS aufgenommen. Die Zellen wurden bei 4000 rpm (CR 422, Jouan) pelletiert und das Zellpellet bei -20°C aufbewahrt. Für die Homogenisierung wurde die Probe aufgetaut, in 25 mM Hepes 0,25 M Saccharose aufgenommen und im Dounce Homogenisator homogenisiert.

2.9.3 Trypanblau Test

Um zu kontrollieren ob die Zellen vollständig homogenisiert wurden, wurde ein Trypanblau Test durchgeführt. (Durch Trypanblau wird der Zellkern angefärbt.) Dazu wurden 10 µl Probe mit 5 µl Trypanblau versetzt, 2 min inkubiert und mikroskopisch analysiert. Es müsse >80% der Zellen defekt, die Zellkerne aber intakt sein.

2.10 Subzelluläre Fraktionierung im Zonalrotor

Das Zellhomogenat beinhaltet die Zellkerne, Zellorganellen und das Cytosol, aber auch Zelltrümmer. Die einzelnen Zellkomponenten besitzen unterschiedliche Dichten und sedimentieren daher auch unterschiedlich schnell. Zunächst wurden die Zellkerne und Zelltrümmer durch Sedimentation aus dem Homogenat entfernt. Sie besitzen eine deutlich höhere Dichte und Größe als die übrigen Zellbestandteile und lassen sich durch Zentrifugation bei 1000 g, 4°C, 10 min (Jouan-Zentrifuge) isolieren. Der Überstand, der die übrigen Zellorganellen und das Cytosol enthält wurde noch mindestens 2x bei 1000 g, 4°C, 10 min zentrifugiert bis kein sichtbares Pellet mehr vorhanden war. Der so erhaltene Überstand wurde dann durch eine Dichtegradienten-Zentrifugation weiter aufgetrennt.

Die cytoplasmatischen Bestandteile sedimentieren mit unterschiedlicher Geschwindigkeit in Saccharose zu unterschiedlichen Dichten und können daher durch Dichtegradienten-Zentrifugation voneinander getrennt werden. Für die Zentrifugation wurde der Zonalrotor Ti 14 (Beckmann) verwendet. Maximal 50 ml postnucleärer Überstand konnten auf einem diskontinuierlichen Saccharosegradienten (55%-15% w/w Saccharose) geschichtet werden.

Der Gradient hatte die Abstufungen wie in Abb. 2.1 beschrieben.

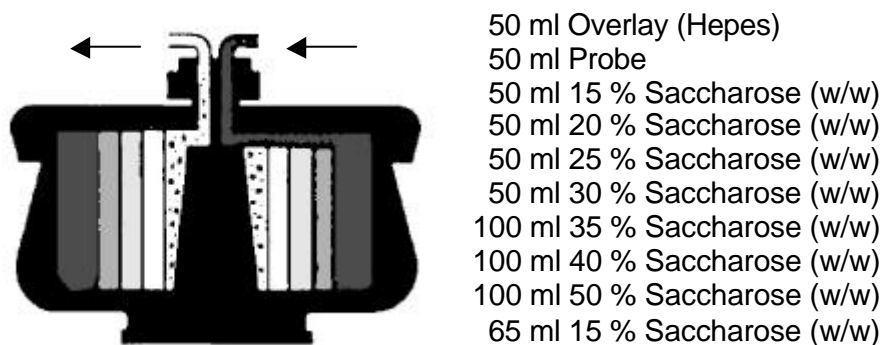


Abb. 2.1 Schema des Zonalrotors. Nach : Techniques of Preparative, Zonal and Continuous Flow Ultracentrifugation, M. Griffith; modifiziert

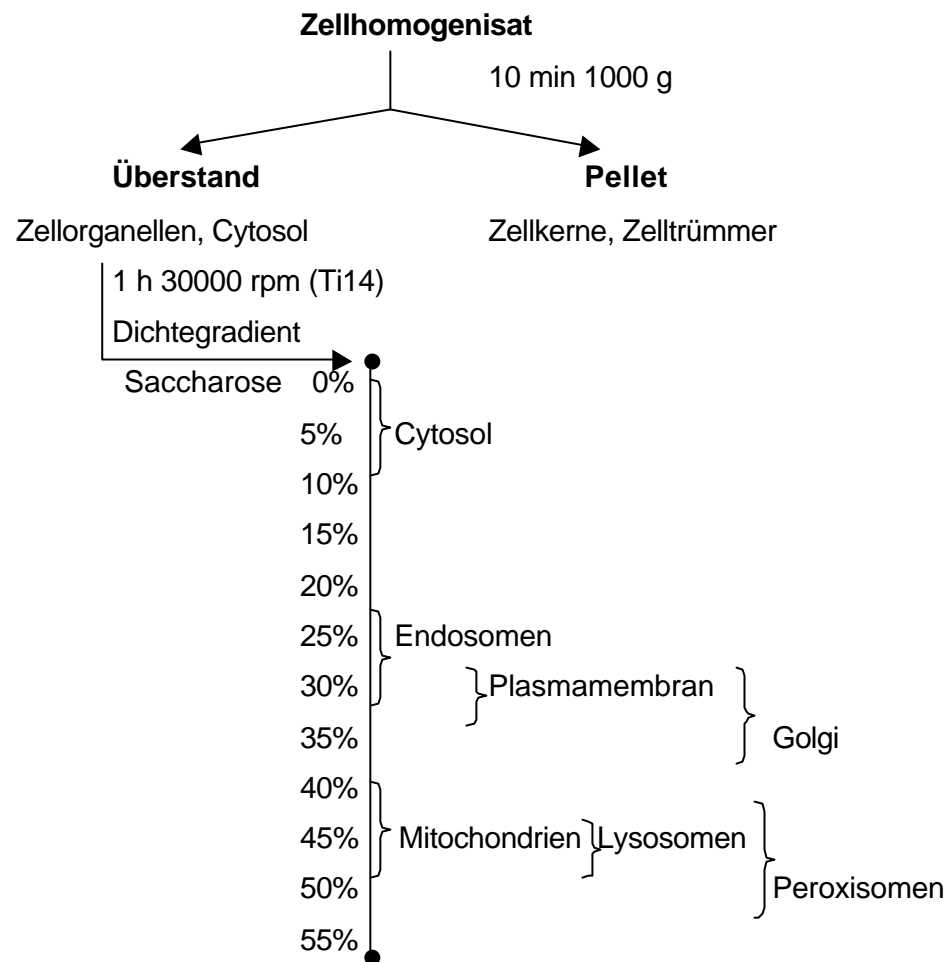


Abb. 2.2 Schema der Fraktionierung von Zellhomogenisat im Saccharosegradienten.

Nach: Preparative Centrifugation; A Practical Approach; D. Rickwood; modifiziert

Der Gradient wurde mit Hilfe einer Schlauchpumpe (Masterflex easy load model 7518 00) bei einer Drehzahl von 2000 rpm des Zonalrotors (Ultrazentrifuge Optima, Beckmann) aufgebaut. Dazu wurde mit Hepes 25 mM begonnen und danach die Probe und anschließend die Saccharoselösungen darüber geschichtet. Die Separierung der Organellen erfolgte bei 30000 rpm, 1h, 10°C. Nach Beendigung der Zentrifugation wurde der Gradient bei 2000 rpm in 25-30 Fraktionen (je ca. 20-25ml) ausgetropft (Fraktionssammler Retriever™500, Isco, Nebraska USA) indem eine dichtere Lösung (55% w/w Saccharose mit 10% KBr) mit Hilfe der Schlauchpumpe in den Rotor gepumpt wurde.

2.10.1 Dichtebestimmung

Die Dichte der einzelnen Fraktionen wurde refraktometrisch ermittelt.

2.10.2 Alkalische- und Saure-Phosphatase Reaktion

Zur Charakterisierung der einzelnen Fraktionen wurde jede Fraktion auf verschiedene Markerenzyme getestet. Die Markerenzyme sind spezifisch für bestimmte Organellen, Membranen oder das Cytosol und ermöglichen es daher die Organellen den entsprechenden Fraktionen zuzuordnen.

Zur Bestimmung der alkalischen-Phosphatase-Aktivität wurden pNPP Tabletten (p-Nitrophenyl Phosphat, Sigma) verwendet. Der Test wurde in einer Mikrotiter Platte durchgeführt. Eine Tablette wurde in 5 ml Natriumborat 25 mM pH 9,8 + MgCl_2 2 mM aufgelöst und je 100 μl /Napf zu 100 μl jeder Fraktion gegeben. Es folgte eine Inkubation von 1 h bei 37°C. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase wurde photometrisch bei 405 nm (Referenz 620 nm) in einem Mikrotiter Photometer (LP400, Diagnostics Pasteur) bestimmt.

Zur Bestimmung der sauren Phosphatase Aktivität wurden auch pNPP Tabletten (p-Nitrophenyl Phosphat, Sigma) verwendet. Der Test wurde in einer Mikrotiter Platte durchgeführt. Eine Tablette wurde in 5 ml Natriumcitrat 10 mM pH5 aufgelöst und je 100 μl /Napf zu 100 μl jeder Fraktion gegeben. Es folgte eine Inkubation von 1h bei 37°C. Die Aktivität der sauren Phosphatase wurde photometrisch bei 405 nm (Referenz 620 nm) bestimmt.

Teilweise wurde die Bestimmung der Alkalischen- und Sauren Phosphatase auch vom Institut für klinische Chemie (Zentrallabor Uni-Klinik Giessen) durchgeführt.

Die Bestimmung der Glutamatdehydrogenase und der Laktatdehydrogenase erfolgte ebenfalls durch das Institut für klinische Chemie. Andere Organellen konnten nur aufgrund ihrer Position im Dichtegradienten charakterisiert werden.

Tab. 2.1 Eigenschaften von Zellorganellen und Membranen. Nach: Preparative Centrifugation; A Practical Approach, D.Rickwood; modifiziert.

Organell	% Proteinanteil des Homogenats	Partikel- größe (μm)	Dichte g/ml	Dichte % Saccharose	Markerenzym
Plasmamembran	0,4-2,5	0,05-3	1,12-1,14	30-34	Alkalische Phosphatase
Zellkern	13	3-12	>1,3	>62	
Mitochondrien	16	0,5-2	1,17-1,21	39-46	Glutamat Dehydrogenase
Lysosomen	2	0,5-0,8	1,19-1,22	43-48	Saure Phosphatase
Endosomen	1	0,1-0,5	1,10-1,13	24-31	
Endoplasmatisches Retikulum	24	0,05-0,3	1,06-1,23	15-60	
Cytosol			1-1,04	1-10	Laktat Dehydrogenase
Golgi	1	0,05-0,5	1,12-1,16	30-37	

2.10.3 Proteingehalt Bestimmung mittels BCA Assay

Die Bestimmung des Proteingehaltes eines Zellysates wurde mit einem BCA-Protein-Assay-Kit (Firma Pierce) durchgeführt. Die Arbeitslösung wurde unmittelbar vor Gebrauch aus 50 Teilen Lösung A und 1 Teil Lösung B gemischt. Das Testprinzip beruht auf dem Nachweis von Proteinen durch die Reduktion von Cu^{2+} - zu Cu^{1+} -Ionen (nach Lowry et al., 1951). Das dabei verwendete Reagenz BCA (Bicinchoninic acid) reagiert spezifisch mit Cu^{1+} -Ionen und Peptiden zu einem Komplex, dessen Extinktion bei einer Wellenlänge von $\lambda=570$ nm gemessen wird. Als Referenzsubstanz zur Ermittlung einer Eichkurve wurde BSA in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Die Probe und der Standard werden in eine Mikrotiterplatte eingefüllt und die Reaktion mit 200 μl Arbeitslösung gestartet. Die Auswertung erfolgt photometrisch nach ca. 30 Minuten.

2.11 Proteolytische Spaltung von HBsAg-Filamenten durch hepatozelluläre Proteasen

Die Spaltung der HBsAg-Filamente wurde mit Proteasen aus Fraktionen der subzellulären Fraktionierung von Lebergewebe bzw. HepG2-Zellen durchgeführt. Es wurden entweder alle Fraktionen eines Gradienten auf ihre proteolytische Aktivität geprüft oder aber nur bestimmte Fraktionen (Endosomen; Plasmamembran; Lysosomen). Als Kontrolle dienten HBsAg-Filamente zu denen statt Proteasen 0,5-0,05 % BSA in Ringerlösung gegeben wurde und HBsAg-Filamente, die mit Trypsin (TPCK Trypsin, Pierce; Stammlösung 500ng/ μl ; 1:200 eingesetzt) über Nacht bei 37°C gespalten wurden. Die Versuche erfolgten sowohl ohne Aufschluß der Organellen als auch mit Aufschluß durch Zugabe von 5% Methanol. Die proteolytische Aktivität wurde sowohl im ELISA (siehe 2.12.) als auch mittels SDS-Gel (siehe 2.13.) und Immunoblot (siehe 2.17.) untersucht.

Für die Charakterisierung der proteolytischen Spaltung im SDS-Gel wurden die Proben nach dem Verdau mit 4x Probenpuffer (siehe 2.2.2.) versetzt, 10 min gekocht und anschließend im Gel aufgetrennt.

Für den Nachweis der Spaltung mittels ELISA wurde die proteolytische Aktivität durch Zugabe von 10% FKS gestoppt und die Proben durch Zugabe von 100 mM Tris HCl pH 7,4 umgepuffert.

2.11.1 Konzentrationsabhängigkeit

Es wurden sowohl Endosomen/Plasmamembran-Fraktionen als auch Lysosomen-Fraktionen in unterschiedlichen Konzentrationen (25 µg-300 ng/Napf) eingesetzt und auf HBsAg-Filamente (50 ng-6 ng/Napf) gegeben. Die Inkubation erfolgte bei pH5 (20 mM Natrium Citrat pH 5) über Nacht bei 37°C.

2.11.2 Kinetik der proteolytischen Spaltung

Es wurden sowohl Endosomen/Plasmamembran-Fraktionen als auch Lysosomen-Fraktionen (2,5 µg/12,5 ng Filamente/Napf) bei pH 5 (20 mM Natrium Citrat pH 5) auf HBsAg-Filamente gegeben und 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 16 h, 24 h bei 37°C inkubiert.

2.11.3 pH-Abhängigkeit

Es wurden sowohl Endosomen/Plasmamembran-Fraktionen als auch Lysosomen-Fraktionen oder alle Fraktionen eines Gradienten getestet (2,5 µg/12,5 ng Filamente/Napf). Die Proben wurden über Nacht mit verschiedenen pH-Werten (pH 4,5-7,4) (20 mM Natrium Citrat bzw. 20 mM Tris HCl) bei 37°C inkubiert.

2.11.4 Inhibition der proteolytischen Spaltung

Es wurden sowohl Endosomen/Plasmamembran-Fraktionen als auch Lysosomen-Fraktionen mit unterschiedlichen Protease Inhibitoren 30 min vorinkubiert und anschließend auf HBsAg-Filamente gegeben (2,5 µg/12,5 ng Filamente/Napf). Die Inkubation erfolgte bei pH 5 (20 mM Natrium Citrat pH 5) über Nacht bei 37°C.

Es wurden folgende Inhibitoren getestet:

Tab. 2.2 Protease Inhibitoren

Inhibitor	Spezifität	Eingesetzte Konzentration
Fetales Kälberserum (FKS, PAN)	Alle Proteasen	10%
Aprotenin (10mg/ml in H ₂ O; Sigma)	Serin-Protease Inhibitor	4 mM
EDTA	Metalloprotease	20 mM
Inhibitor Cocktail (Complete™,Mini, EDTA frei, Hoffmann-La Roche)	Serin-,Cystein-Protease Inhibitor	Nach Angabe des Herstellers und in 5 facher Konzentration eingesetzt.

2.12 ELISA zur Bestimmung der Proteaseaktivität von Subzellulären Fraktionen

In diesem ELISA wurden gereinigte Filamente (Abschnitt 2.7.4) entweder unbehandelt oder nach proteolytischer Behandlung (siehe 2.11), auf ihren Gehalt an SHBs, MHBs und LHBs getestet.

Beschichtung:

Eine Mikrotiterplatte (Maxisorb, Nunc, Wiesbaden) wurde mit den Antikörpern Anti-HBs (C20-2 1mg/ml 1:1000; 1-9C1 1:500), Anti-PreS2 (2-11B1 0,7mg/ml 1:1000, S26 1:500) Anti-PreS1 (MA18-7 1mg/ml 1:500) (Abschnitt 2.3.1) beschichtet. Dazu wurden die Antikörper in NaPP 0,0175 M, pH 7,6 (Abschnitt 2.2.1) in der angegebenen Konzentration aufgenommen und je 100 µl/Napf eingefüllt. Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C.

Nachabsättigung:

Die Nachabsättigung erfolgte durch Zugabe von 1% BSA in PBS. Es wurden 200 µl/Napf eingefüllt und 2 h bei 37°C inkubiert.

Waschen:

Die Platte wurde 2 x mit 0,25% Tween in PBS und 3 x mit PBS gewaschen (ELISA-Wascher Columbus, Crailsheim)

Antigenzugabe:

Es wurden 50 µl oder 100 µl Probe bzw. Kontrolle/Napf eingefüllt.

Inkubiert wurde für 2 h bei 37°C.

waschen: siehe oben

Konjugat:

Als Konjugat wurde der Antikörper Anti-HBs-POD (Abschnitt 2.3.2) verwendet, er wurde im Verhältnis 1:200 in 1% Casein in PBS (Pierce) aufgenommen und je 100 µl/Napf eingefüllt. Die Inkubation erfolgte 1 h bei Raumtemperatur.

Waschen: siehe oben

Detektion:

Zur Detektion des POD markierten Konjugats wurde eine Tablette OPD (o-Phenylendiamin, Abbott) in 5 ml Puffer (Abbott) aufgelöst und 100 µl/Napf eingefüllt. Nach 15-minütiger lichtgeschützter Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von je 100 µl/Napf H_2SO_4 1 M gestoppt. Die Extinktion des umgesetzten POD-Substrats wurde bei 492 nm im Mikrotiter Photometer (LP 400, Diagnostics, Pasteur) gemessen (Referenzwellenlänge 620 nm).

2.13 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Zur Analyse und Größenbestimmung wurden Proteine in SDS-Polyacrylamid-N,N'-Methylen-bis-Acrylamidgelen im diskontinuierlichen Puffersystem nach Laemmli aufgetrennt. Durch das SDS wird eine annähernd größenproportionale Ladung in die Proteine gebracht und die Proteine daher nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Das SDS führt dazu, daß alle Proteine negative Ladung haben und daher zum Pluspol wandern, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit größenabhängig ist.

Es wurden 12%-ige Trenn- und 5%-ige Sammelgele verwendet. Die Gelelektrophoresen wurden im „Tall-Mighty Small“ System (8 x 11 cm, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA) oder in einem großen Gel (15 x 18 cm, 2 mm Dicke, Apparatur der Firma BioRad, München) durchgeführt. Die Trenn- und Sammelgele wurden nach folgenden Angaben hergestellt:

Tab.2.3 Pipettierschema für Polyacrylamidgele

	12 % Trenngel:	5 % Sammelgel:
Acrylamidlösung	20 ml	2,5 ml
Trenngelpuffer 4 x	12,5 ml	
Sammelgelpuffer 4 x		3,8 ml
H₂O	17,5 ml	8,7 ml
AMPS	240 µl	75 µl
TEMED	41 µl	41 µl
1 % Bromphenolblau		15 µl

Vor der Zugabe der Polymerisationsstarter TEMED und AMPS wurden die Trenn- bzw. Sammelgellösung für 2-5 min entgast, da der Luftsauerstoff die Polymerisation stört. Nachdem die Trenngele gegossen waren, wurde jedes Gel zum Abschluß vor Luftsauerstoff mit 20% Methanol überschichtet. Bei mehreren Gelen in einer Kammer mußte jedes Gel mit der gleichen Menge Methanol überschichtet werden, um gleich große Trenngele zu erhalten. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Methanol entfernt und die Sammelgellösung eingefüllt, in die dann die Teflon-Gelkämme eingesetzt wurden. Die Gele wurden nach dem Polymerisieren in die Elektrophoreseapparatur (Hoefer bzw. Biorad s.o.) eingespannt und die Kammer mit Laufpuffer gefüllt. Die Proben wurden mit 4 x Probenpuffer (Abschnitt 2.2.) vermischt, 10 min bei 100°C gekocht, kurz abzentrifugiert und in die Taschen des Sammelgels eingefüllt. Zur Molekulargewichtsabschätzung wurden Proteinmarker (Low-molekular-

weight, Bio-rad, München) oder ein vorgefärbter Proteinstandard (Rainbow-Protein-Molekulargewichtsmarker, Amersham, Braunschweig) mitaufgetrennt. Die Elektrophorese wurde mit 20-40 mA durchgeführt.

2.14 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Durch Silberfärbung können Proteinbanden im Gel sichtbar gemacht werden. Diese Methode ist sehr empfindlich, so daß Banden mit nur 1-10 ng Protein nachweisbar sind.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele für mindestens 90 min zum Fixieren der Proteine in 50% Methanol inkubiert. Danach wurden sie 5 min mit H₂O gewaschen und anschließend in frisch angesetzter Silbernitratlösung (Abschnitt 2.2.3.) geschüttelt. Nach 10-minütigem waschen in H₂O wurden sie in Reducer (Abschnitt 2.2.3.) geschwenkt, bis die gewünschte Bandenstärke erreicht war (max. 20 min). Zur Fixierung der Färbung wurden die Gele 2 min in Fixierer (aus dem Fotolabor) geschwenkt und anschließend 10 min in H₂O gespült.

2.15 Trocknen von Polyacrylamidgelen

Die Gele wurden im Geltrocknungsrahmen zwischen zwei Cellophan-Papieren getrocknet (Roth, Karlsruhe). Das Gel wurde vor dem Trocknen für mindestens 30 min in 20% Ethanol/10% Glycerin geschwenkt. Pro Gel wurden 2 Blatt Cellophan in H₂O eingeweicht und anschließend wurde ein Blatt Cellophan luftblasenfrei auf die Platte des Geltrocknungsrahmen gelegt. Das Gel wurde luftblasenfrei in die Mitte des Cellophans plaziert und ca. 1-2 ml Ethanol/Glycerin auf das Gel pipettiert. Das zweite Blatt Cellophan wurde luftblasenfrei über das Gel gelegt und der Rahmen darüber mit Klammern befestigt. In horizontaler Lage wurde das Gel bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet.

2.16 Elektroblothing

Durch SDS-Gelelektrophorese getrennte Proteine können für weitere Analysen auf eine Membran, z.B. Polyvinylidendifluorid (PVDF), übertragen werden. Die hier beschriebene Technik folgt im wesentlichen der von Gültekin und Heermann entwickelten (Gültekin und Heermann, 1988). Die Übertragung der Proteine (Western Blotting) auf die Membran erfolgt durch ein angelegtes elektrisches Feld in einem bestimmten Puffersystem.

Die PVDF Blotmembran (Immobilon P, Millipore, Eschborn) wurde kurz mit 100% Methanol benetzt und danach zusammen mit Filterpapier (Schleicher & Schüll, Dassel) mehrere Minuten in Transferpuffer (siehe 2.2.4) äquilibriert. Zusammen mit dem Gel wurden die einzelnen Komponenten im Sandwich-System (Filterpapier, Gel, Membran, Filterpapier) in die Blottingapparatur (BioRad) eingesetzt, sodaß die PVDF Membran der Anode zugewandt war. Der Blotvorgang wurde über Nacht bei 15-30 mA oder über 2 h bei 100-200 mA durchgeführt.

2.17 Immunblot

Für immunologische Analysen wurden HBsAg-Filamente unbehandelt oder nach Protease-Behandlung (siehe 2.11) auf einem SDS-Gel aufgetrennt (siehe 2.13.) und auf eine PVDF Membran übertragen (siehe 2.16). Die PVDF Membran wurde zum Blockieren 30 min bei Raumtemperatur in 3% Milchpulver in PBS inkubiert. Die Inkubation mit den entsprechenden Primärantikörpern (1-9C1; 2-11B1; 2-12F2; S26; 1-9D1; MA18-7 siehe 2.3.1) erfolgte 2 h bei 37°C in einer Verdünnung von 1:500 bzw. 1:1000 für gereinigte Antikörper, Ascites 1:200 in 3% Milchpulver in PBS oder Hybridom Überstände wurden unverdünnt eingesetzt. Danach wurde dreimal mit Waschpuffer (PBS; 0,5% Tween 20) gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper, der mit alkalischer Phosphatase (AP) oder Peroxydase (POD) konjugiert war (Anti-Maus AP; Anti-Maus POD siehe 2.3.2), erfolgte in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS 1 h bei Raumtemperatur. Der Blot wurde danach dreimal mit Waschpuffer (s.o.) gewaschen.

Die Entwicklung erfolgte bis zum Erreichen der erwünschten Bandenintensität bei Verwendung des AP konjugierten Antikörpers mit 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate/nitroblue tetrazolium-Substratlösung (BCIP/NBT; Sigma Fast™, Sigma) und wurde durch Spülen in H₂O (spätestens nach 30 min) gestoppt. Die Membran wurde luftgetrocknet. Wurde der POD konjugierte Antikörper verwendet erfolgte die Entwicklung entweder mit ECL-Substrat Lösung (aus eigener Herstellung siehe 2.2.5) oder mit 3,3'-Diaminobenzidine Tabletten (DAB; Sigma). Im Falle der ECL-Entwicklung wurde der Blot 1 min mit dem ECL-Substrat inkubiert, das Substrat anschließend entfernt, mehrere Röntgenfilme mit unterschiedlich langen Expositionszeiten auf den Blot aufgelegt und entwickelt. Im Falle des DAB-Substrates wurde die Reaktion nach Erreichen der gewünschten Bandenstärke (spätestens nach 30 min) durch spülen in H₂O gestoppt.

2.18 Interaktion von proteolytisch verdaulichem HBsAg mit der Hepatom Zelllinie HepG2

Um die Interaktion von HBsAg mit HepG2-Zellen und ihre Änderung nach proteolytischer Behandlung des Antigens zu untersuchen wurden HBsAg-Filamente mit der proteasehaltigen Plasmamembran/Endosomen Fraktion aus porciner Leber über Nacht bei 37°C verdaut (im Verhältnis 40 µg/100 ng HBsAg). Als Kontrollen dienten unverdautes HBsAg und HBsAg welches mit Trypsin oder V8 behandelt worden war. Die Trypsinierung und V8 Behandlung der HBsAg-Filamente erfolgte bis zum vollständigen Verdau (1 µg Trypsin/50 µg HBsAg, 2h, 37°C; 10 µg V8/50 µg HBsAg, ü.N., 37°C). Der Nachweis der Spaltung erfolgte im Silbergel (siehe 2.14). Reinheit und Konzentration der käuflichen Proteasen ermöglichten eine Abtrennung der Enzyme durch Ultrafiltration (300k, Pall Filtron). Da die optimale Konzentration für die proteolytische Spaltung von HBsAg durch hepatozelluläre Proteasen auch in diesem Versuch beibehalten werden sollte, konnte im Ansatz nur eine geringe Menge HBsAg verdaut werden. Aufgrund der geringen Menge an HBsAg und der unbekannten Größe der Proteasen konnten diese nicht durch Ultrafiltration abgetrennt werden.

HepG2-Zellen wurden wie unter 2.4 beschrieben gehalten und auf Zellkulturschalen mit einer Kulturfläche von 9,6 cm² ausplattiert und kultiviert bis ein semiconfluent Zellrasen gewachsen war. Anschließend wurden die Zellen mit Medium (siehe 2.2.6) + 10 mM Hepes gewaschen und die Inokulate in Medium + 10 mM Hepes auf die Zellen gegeben. Die Versuche mit käuflichen Proteasen wurden mit 5 µg HBsAg/ml und Zellkulturschale durchgeführt. Bei den Versuchen mit den aus porciner Leber gewonnenen Proteasegemisch musste ein bestimmtes Verhältnis von Proteasehaltiger Probe : HBsAg für eine optimale Proteolyse eingehalten werden (siehe 3.6). Deshalb wurden diese Versuche mit 800 ng HBsAg/ Zellkulturschale durchgeführt. Es folgte eine Inkubation für 0 min, 30 min, 60 min oder 120 min bei 37°C. Nach dieser Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt, die Zellen gewaschen und der Zellrasen von der Platte mit einem Zellschaber abgekratzt. Die Zellen wurden bei 200 g, 3 min, 4°C pellettiert, gewaschen und in 500 µl Medium + 10 mM Hepes aufgenommen. Die Zellsuspension wurde geteilt und die eine Hälfte durch 10 sec. Ultraschall desintegriert. Die Menge an HBsAg an intakten und zerstörten HepG2-Zellen wurde im quantitativen ELISA unter Mitführung einer Verdünnungsreihe gereinigtes HBsAg bestimmt (siehe 2.12). Der ELISA wurde mit dem SHBs Antikörper C20-02 (1 mg/ml, 1:1000) (siehe 2.3.1) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Aufreinigung von Filamenten aus Serum HBV infizierter Patienten

Ziel der Arbeit war es Proteasen in subzelluläre Fraktionen von Leberzellen auf die HBV-Hüllproteine wirken zu lassen. Als Quelle für die Hüllproteine diente Blutplasma eines HBV-Trägers. Da Viren nur in vergleichsweise geringer Menge ($< 1 \mu\text{g/ml}$) enthalten sind, wurde die HBsAg-Filament Fraktion herangezogen, welche praktisch die gleichen Virusproteine enthält wie die Virushülle. Plasma enthält große Mengen Protein ($\sim 60 \text{ mg/ml}$) und hochwirksame Proteaseinhibitoren, insbesondere $\alpha 2$ -Makroglobulin. Daher sollten die HBsAg-Filamente in möglichst reiner Form gewonnen werden. Auch die im Überschuss vorhandenen HBsAg Sphären sollten abgetrennt werden, da sie die vermutlichen Zielstrukturen (MHBs und LHBs) der postulierten Proteasen in geringerem Anteil enthalten. HBsAg-Filamente sind relativ groß (Durchmesser 20 nm, Länge $> 50 \text{ nm}$), während fast alle Serumproteine viel kleiner sind. Die großen Lipoproteine haben dagegen eine viel geringere Dichte als die HBsAg-Filamente ($1,16 \text{ g/ml}$ in Saccharose). Das ermöglichte eine weitgehende Reinigung durch drei Zentrifugationsschritte.

3.1.1 Erster Schritt: Ratenzonale Sedimentation

Im ersten Aufreinigungsschritt wurden Viren, Filamente und Sphären aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe und Dichte in Saccharose voneinander getrennt. Viren, die im Inneren der Virushülle ein nukleinsäurehaltiges, lipidfreies Core besitzen, haben eine höhere Dichte als die nukleinsäurefreien, lipidhaltigen subviralen Partikel. Sphären sind kleiner als Filamente und erreichen unter den gewählten Bedingungen nicht ihre Enddichte. Serumproteine sind noch kleiner und sedimentieren unter den gewählten Bedingungen nur wenig.

Zur Gewinnung der viralen und subviralen Partikel wurden 19 ml hochtitriges, HBV-haltiges Plasma eines chronisch mit HBV infizierten Patienten in einem 15-60% (w/w) diskontinuierlichen Saccharosegradienten zentrifugiert. Der Gradient wurde in 28 Fraktionen von ca. 1-1,5 ml ausgetropft und die Dichte bestimmt. Um Hinweise zum Proteingehalt der einzelnen Fraktionen zu erhalten, wurde von jeder Fraktion die optische Dichte bei $\lambda 280 \text{ nm}$ gemessen.

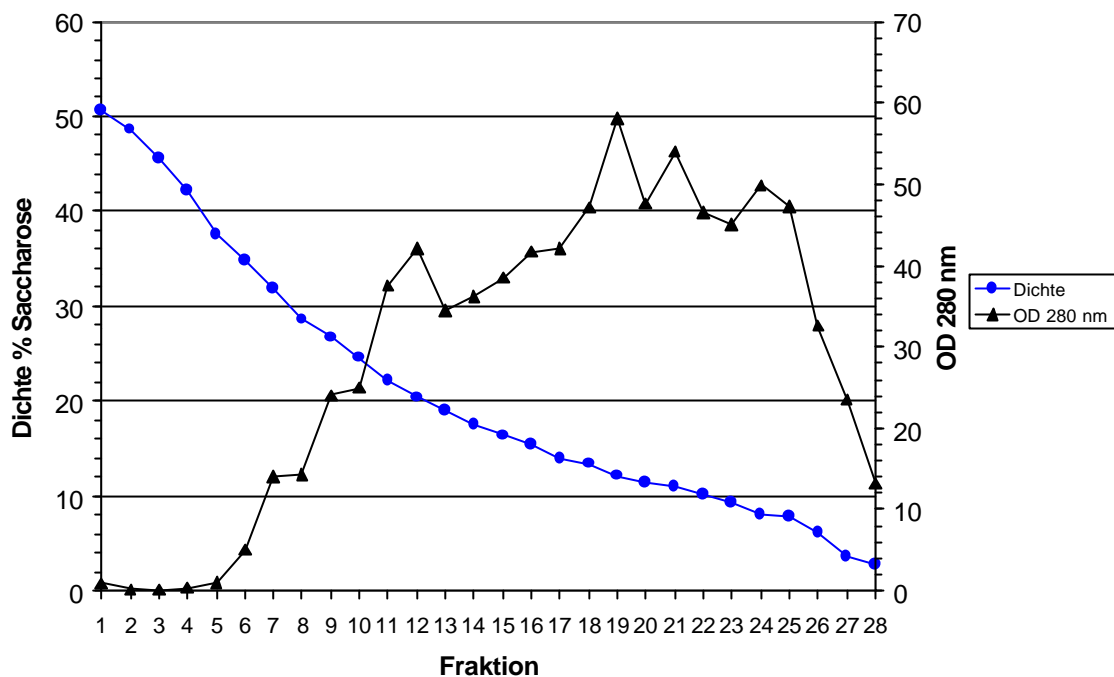


Abb. 3.1 Proteinverteilung im fraktionierten Saccharose-Dichtegradient

Die Proteinmenge ist am Beginn des Gradienten bei hohen Saccharose Dichten sehr gering, steigt aber ab Fraktion 5 (38% Saccharose) steil an und erreicht bei Fraktion 19 (12% Saccharose) ihr Maximum. Zur genaueren Charakterisierung der Verteilung der subviralen Partikel neben der großen Menge an Serumprotein wurden Aliquots der Fraktionen in einem 12%-igem SDS-Polyacrylamid Gel elektrophoretisch aufgetrennt und die enthaltenen Proteine mittels Silber gefärbt. Filamente und Sphären weisen im Gel ein typisches Bandenmuster auf, das durch die verschiedenen Hüllproteine und deren Glykosilierungsstatus entsteht:

SHBs (p25; gp28); MHBs (gp33; gp36); LHBs (p39; gp42) (siehe Abbildung 3.2).

Die Viren lassen sich in einem solchen Gel nur schwer nachweisen, da sie in deutlich geringeren Mengen vorhanden sind als die subviralen Partikel. Virushaltige Fraktionen wurden daher durch Nachweis viraler DNA bestimmt (Daten nicht gezeigt).

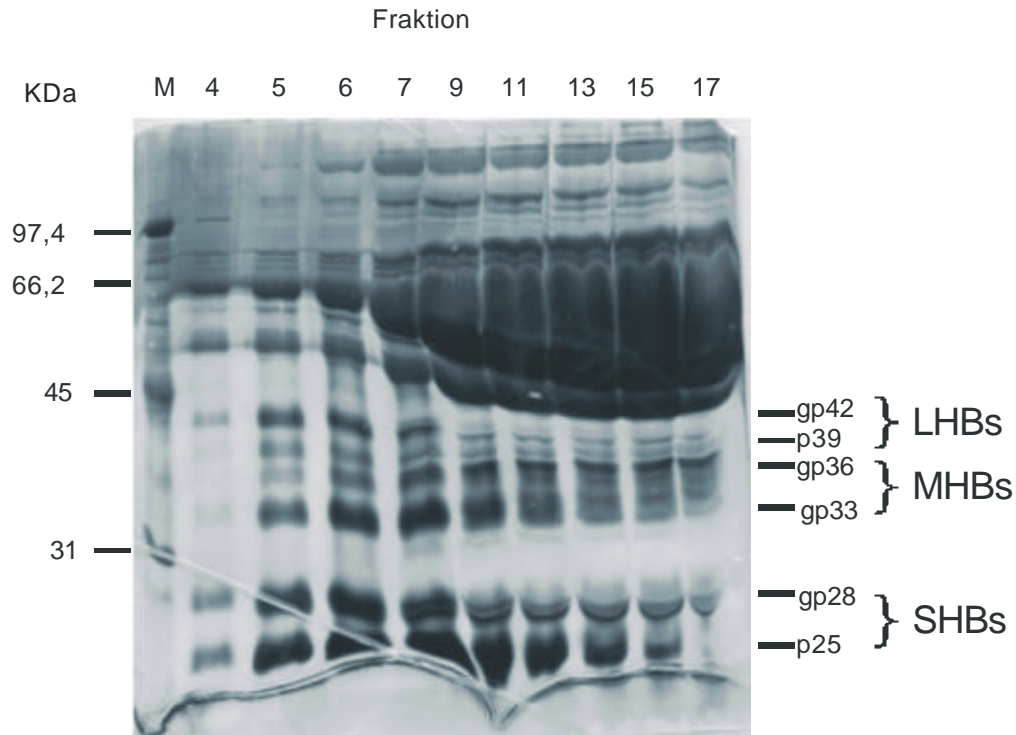


Abb. 3.2 Proteinzusammensetzung verschiedener Fraktionen des Saccharose-Dichtegradienten nach Auftrennung im SDS-Polyacrylamid Gel und anschließender Silberfärbung. Zur Bestimmung der Proteingröße wurde der Größen-Marker (M) Low-Molekulargewicht (Biorad) aufgetragen. kDa : Kilodalton

Man erkennt, dass der HBs-Proteingehalt mit abnehmender Dichte der Fraktionen zunächst zunimmt (Fraktion 5-11) und danach wieder abnimmt. Während der Fremdproteinanteil der Fraktionen 4, 5 und 6 noch gering ist, steigt dieser ab Fraktion 7 deutlich an. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Albumin (66 kDa), welches eine Hauptproteinkomponente des Plasmas darstellt.

Bei der weiteren Reinigung der subviralen Partikel wurden filament- und sphärenhaltige Fraktionen getrennt voneinander weiterbearbeitet. Filamente zeichnen sich im Gegensatz zu Sphären durch einen höheren Gehalt an LHBs aus und sind deshalb erkennbar an den starken LHBs-Banden (gp42/ p39). In den Fraktionen 4, 5 und 6 liegt die Hauptmenge der Filamente vor. Die Fraktionen 7-15 zeigten trotz starker SHBs- und MHBs-Banden einen geringeren LHBs Anteil, so daß ein Pool dieser Fraktionen die Hauptmenge der Sphären enthielt.

3.1.2 Zweiter Schritt: Cäsiumchlorid-Flotation

In diesem Reinigungsschritt sollte das verbliebene Fremdprotein von den Filamenten entfernt werden. Dazu wurden die Fraktionen der ersten Reinigung, die Filamente enthielten (Fraktion 46) vereinigt, mit Cäsiumchlorid auf eine Dichte von 1,31 g/ml

eingestellt, im Gradienten geschichtet und durch Ultrazentrifugation entsprechend ihrer Dichte flottiert. Die Hauptmenge der lipidfreien Serumproteine verbleibt bei einer Dichte von etwa 1,30. Der Gradient wurde in 32 Fraktionen von ca. 1-1,5 ml ausgetropft und die Dichte sowie die optische Dichte bei λ 280 nm bestimmt.

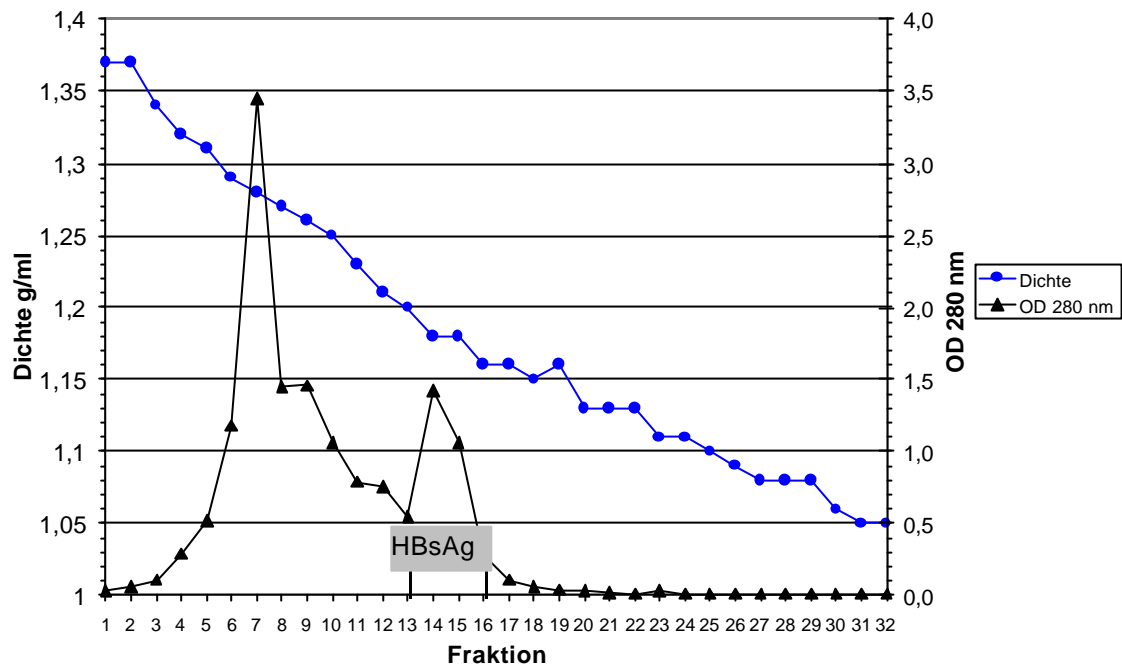


Abb. 3.3 Proteinverteilung im fraktionierten Cäsiumchlorid-Dichtegradient

Die Hauptmenge an Protein befindet sich bei einer Dichte von 1,29-1,27 g/ml (Fraktion 6-8). Filamente bandieren in Cäsiumchlorid bei geringeren Dichten, sie sind daher im Bereich des zweiten Peaks (Fraktion 13-16) zu finden. Um genauere Information über die Proteinzusammensetzung der einzelnen Fraktionen zu erhalten wurde eine SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese mit anschließender Silberfärbung durchgeführt.

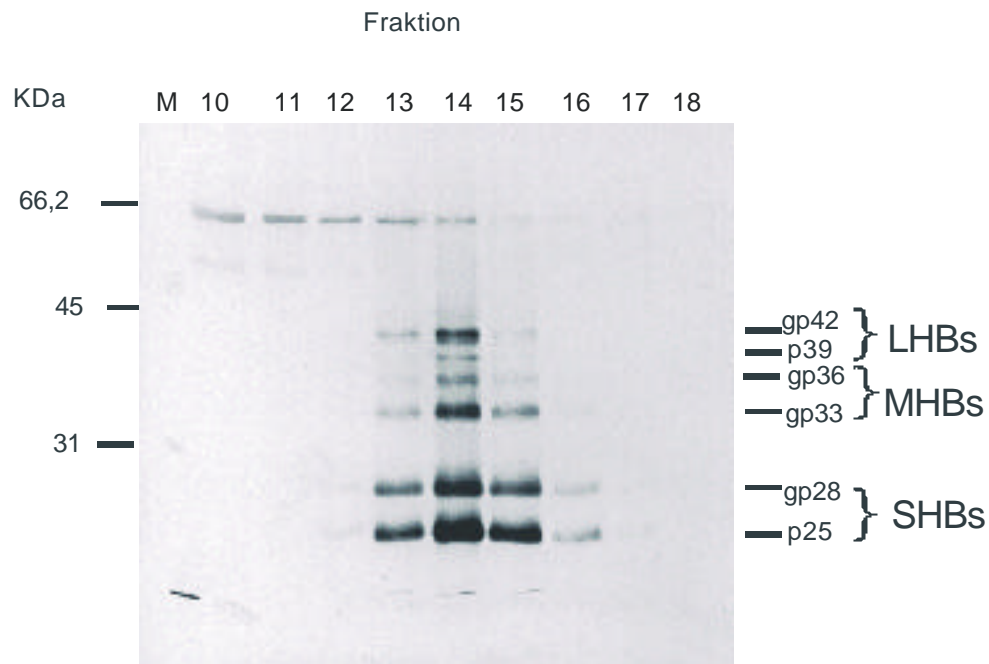


Abb. 3.4 Proteinzusammensetzung verschiedener Fraktionen des Cäsiumchlorid-Dichtegradienten nach Auftrennung im SDS-Polyacrylamid Gel und anschließender Silberfärbung. Zur Bestimmung der Proteingröße wurde der Größen-Marker (M) Low-Molekular-Weight (Biorad) aufgetragen. kDa : Kilodalton

Die Filamente befinden sich hauptsächlich in den Fraktionen 13-16 (Dichte 1,20-1,16 g/ml). Die Menge an Fremdprotein nimmt mit abnehmender Dichte konstant ab. Die Fraktionen 13-16 wurden in einem dritten Reinigungsschritt weiter aufgereinigt.

3.1.3 Dritter Schritt: Ratenzonale Sedimentation

In diesem Reinigungsschritt sollte das letzte kontaminierende Restprotein weitgehend von den Filamenten abgetrennt werden. Dazu wurden die entsprechenden Fraktionen aus dem zweiten Reinigungsschritt gepoolt und durch Ultrafiltration auf eine Saccharosedichte von < 5% (w/w) eingestellt. Anschließend wurden sie in einem diskontinuierlichen Saccharose-Dichtegradienten zentrifugiert, in 31 Fraktionen ausgetropft und die Saccharosedichte sowie die optische Dichte bei λ 280 nm bestimmt.

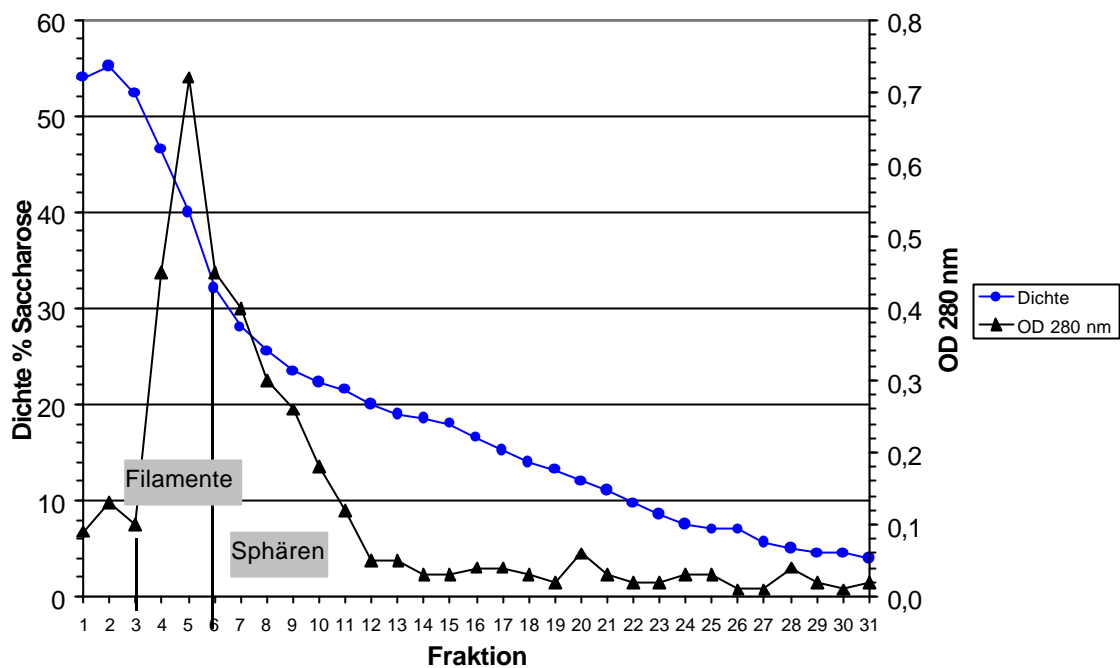


Abb. 3.5 Proteinverteilung im fraktionierten Saccharose-Dichtegradient

Die Fraktionen 3-12 (52-20% Saccharose) enthielten die höchste Proteinkonzentration, danach fällt die Kurve stark ab. Ein Vergleich mit Abbildung 3.1 zeigt, dass ein Großteil des Fremdproteins entfernt wurde. Die Analyse der Fraktionen im silbergefärbten SDS-Polyacrylamid Gel (Abb. 3.6) zeigte eine Konzentrierung der Filamente in den Fraktionen 3-6. Aufgrund der Konzentration der LHBs-Proteine (p39/gp42) der einzelnen Fraktionen ließ sich schließen, dass die Fraktionen 3-5 große Mengen an Filamenten enthielten, während die Fraktionen 6-12 (geringere LHBs-Konzentration) steigende Mengen an Sphären enthielten.

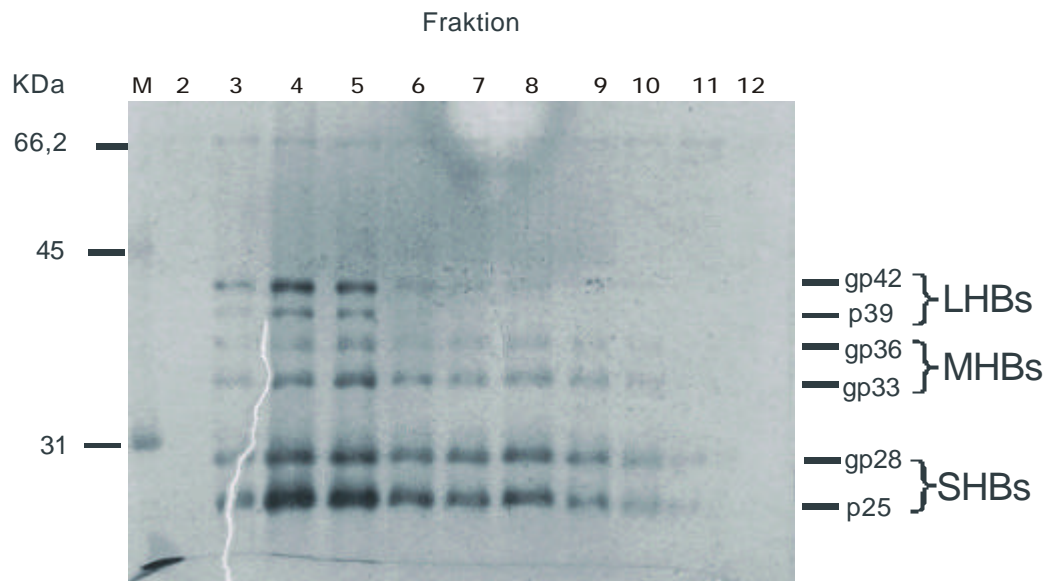


Abb. 3.6 Proteinzusammensetzung verschiedener Fraktionen des Saccharose-Dichtegradienten nach Auftrennung im SDS-Polyacrylamid Gel und anschließender Silberfärbung. Zur Bestimmung der Proteingröße wurde der Größen-Marker (M) Low-Molekular-Weight (Biorad) aufgetragen. kDa : Kilodalton

3.1.4 Abschließende Reinigung durch Ultrafiltration

Zur Entfernung der Saccharose und zur Konzentrierung der subviralen Partikel wurden die Hauptfraktionen der Filamente mit Hilfe eines Molekularsiebs (100 kDa Ausschlussgrenze) weiter aufgereinigt. Nach dreimaliger Filtration sank die Saccharosekonzentration von über 30% auf unter 1% im Retentat. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein UV-Spektrum der Proben von $\lambda = 210\text{-}310$ nm aufgenommen. In Abb. 3.7 ist bei $\lambda = 290$ nm eine deutliche Schulter im OD-Spektrum zu erkennen, die durch den hohen Tryptophananteil des HBsAg hervorgerufen wird und nur bei Proben mit niedrigem Fremdproteinanteil sichtbar ist (pers. Mitteilung W.H. Gerlich). Zur Abschätzung der HBsAg-Menge wurde die Absorption bei $\lambda = 280$ nm bestimmt. Zur Berechnung der Konzentration der subviralen Partikel gilt:

$$4,3 \text{ OD}_{280} = 1 \text{ mg/ml (Gerlich und Thomssen, 1975).}$$

Die gemessene OD 280 beträgt 0,68 dies entspricht 158 $\mu\text{g/ml}$. Bezogen auf 2 ml Endvolumen konnten also insgesamt 316 μg HBsAg vorwiegend in Form von Filamenten aus 19 ml Spenderplasma isoliert werden.

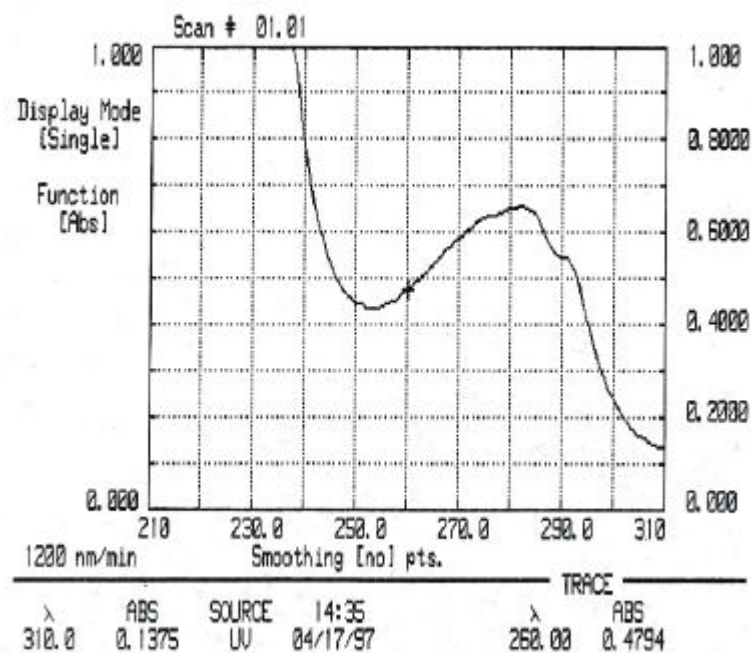


Abb. 3.7 UV Spektrum der Filamente nach der 3. Reinigung und Ultrafiltration

3.1.5 Elektronenmikroskopische Aufnahme der gereinigten Filamente

Um zu überprüfen inwieweit die gereinigte Probe noch Sphären und Viren enthält wurde eine elektronenmikroskopische Aufnahme der Probe angefertigt. Die Filamente wurden auf ein beschichtetes elektronenmikroskopisches Kupfernetzchen aufgetragen, fixiert und in einem Transmissions-Elektronenmikroskop bei einer Vergrößerung von 1:63.000 visualisiert (Abb. 3.8). Man erkennt mehrere unterschiedlich lange Filamente, sowie Viruspartikel und Sphären.



Abb. 3.8 Elektronenmikroskopische Aufnahme der Filament-Präparation, Vergrößerung 1:63.000

3.2 Subzelluläre Fraktionierung von Leberzellen

Wie alle Zellen beinhalten Leberzellen verschiedene Organellen und Membranen sowie den Zellkern und das Cytosol. Um die proteolytische Aktivität der verschiedenen Kompartimente gegenüber HBsAg untersuchen zu können, müssen die einzelnen Kompartimente voneinander getrennt werden. Dazu wurden die Zellen zunächst homogenisiert, sodass die Zellen zwar zerstört wurden, die Organellen und der Zellkern jedoch weitgehend intakt blieben. Der Zellkern unterscheidet sich von den übrigen Organellen deutlich durch Größe und Dichte und lässt sich daher leicht durch Zentrifugation pelletieren und so von den übrigen Organellen abtrennen. Aber auch die übrigen Organellen und Membranen besitzen unterschiedliche Größen und Dichten und lassen sich daher durch Sedimentation im Dichtegradienten voneinander trennen. Die Mitochondrien und Lysosomen sedimentieren unter den gewählten Bedingungen bis zu ihrer Enddichte, ebenso die großen, aber weniger dichten Plasmamembranen. In einem solchen Gradienten kann auch das Cytosol, von den Organellen abgetrennt werden, da die löslichen Proteine des Cytosols unter den gewählten Bedingungen nur wenig sedimentieren. Der postnukleäre Überstand wurde im Zonalrotor auf einen Dichtegradienten von 15-55% (w/w) Saccharose geschichtet, zentrifugiert, in Fraktionen ausgetropft und die Saccharosedichte, sowie der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen bestimmt. Um die einzelnen Fraktionen in Bezug auf die verschiedenen Kompartimente noch genauer zu analysieren, wurden Markerenzymtests durchgeführt. Die Markerenzyme sind spezifisch in einem bestimmten Organell, einer Membran oder dem Cytosol zu finden, so dass man vom Vorhandensein eines Markerenzym Rückschlüsse auf das in dieser Fraktion vorhandene Organell ziehen kann. Getestet wurden die Markerenzyme: Laktat-Dehydrogenase für Cytosol, Glutamat-Dehydrogenase für Mitochondrien, Saure Phosphatase für Lysosomen und Alkalische Phosphatase für die Plasmamembran. Neben diesen Markern diente auch die aus der Literatur bekannte Dichte der einzelnen Kompartimente zur Charakterisierung der Fraktionen. Die subzelluläre Fraktionierung wurde sowohl mit porciner Leber als auch mit humaner Leber und HepG2-Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.9-3.11 dargestellt.

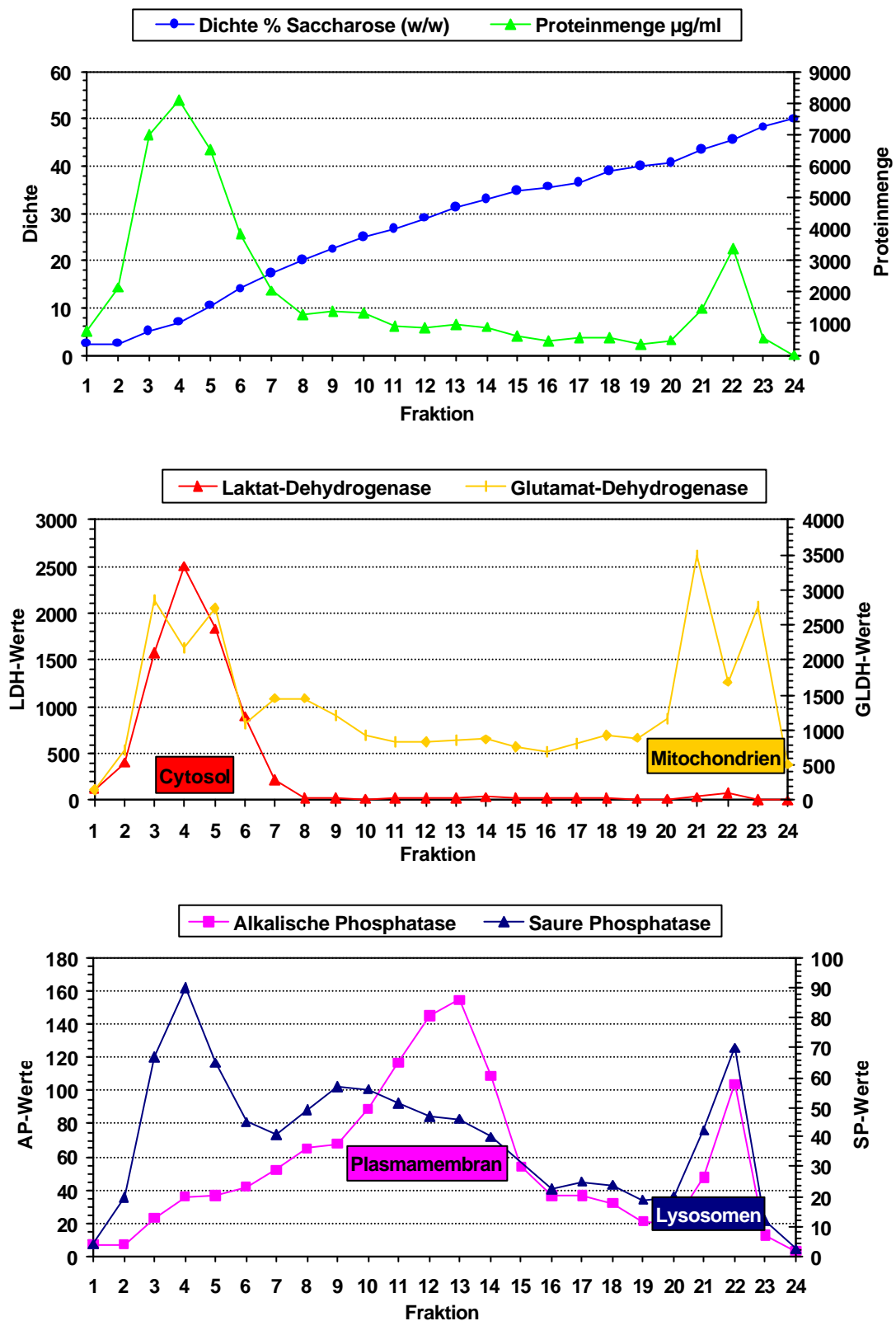


Abb. 3.9 Subzelluläre Fraktionierung von porciner Leber. Es wurden 10 g frische Leber homogenisiert und subzellulär fraktioniert.

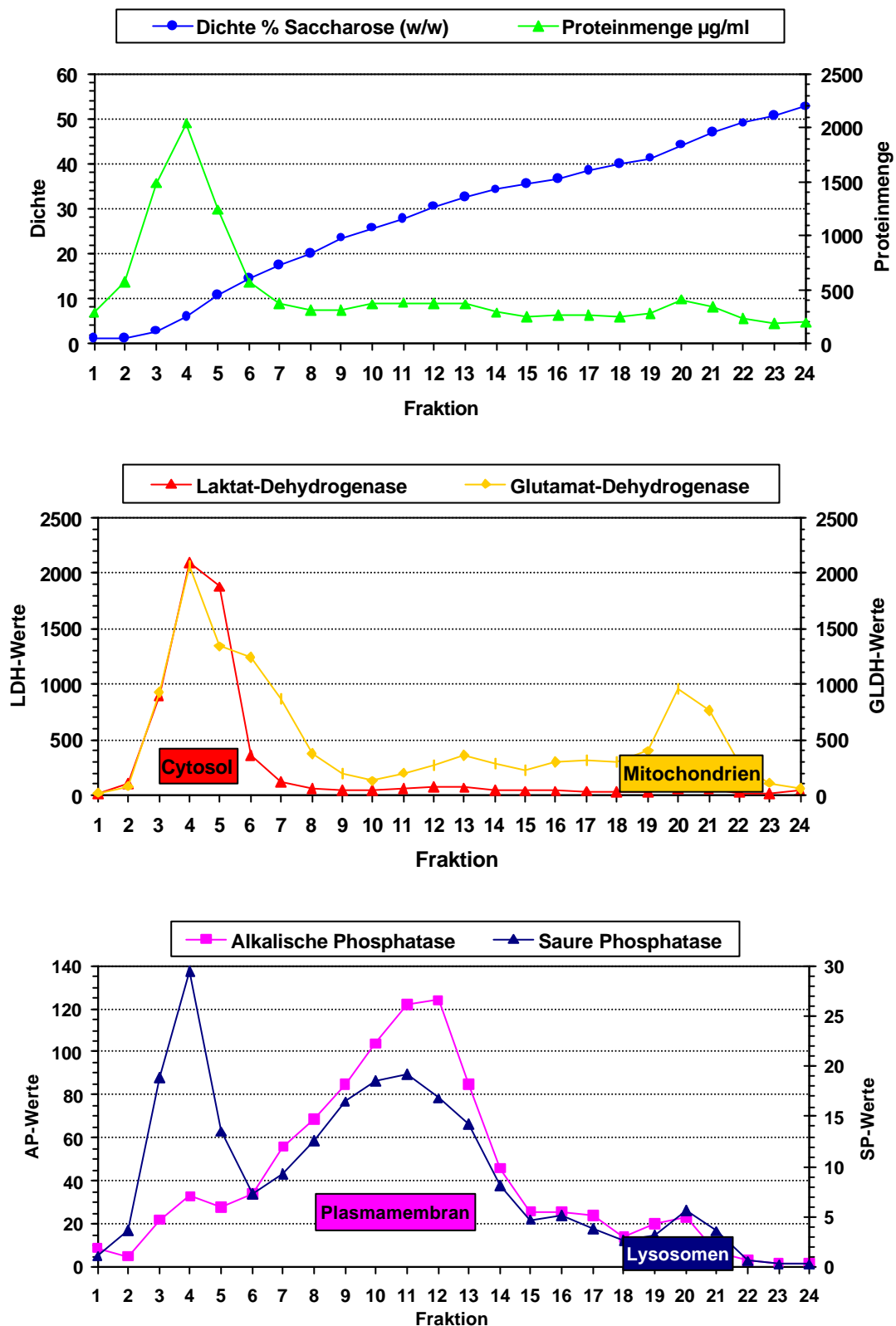


Abb. 3.10 Subzelluläre Fraktionierung von humaner Leber. Es wurden 3,5 g Leber homogenisiert und subzellulär fraktioniert.

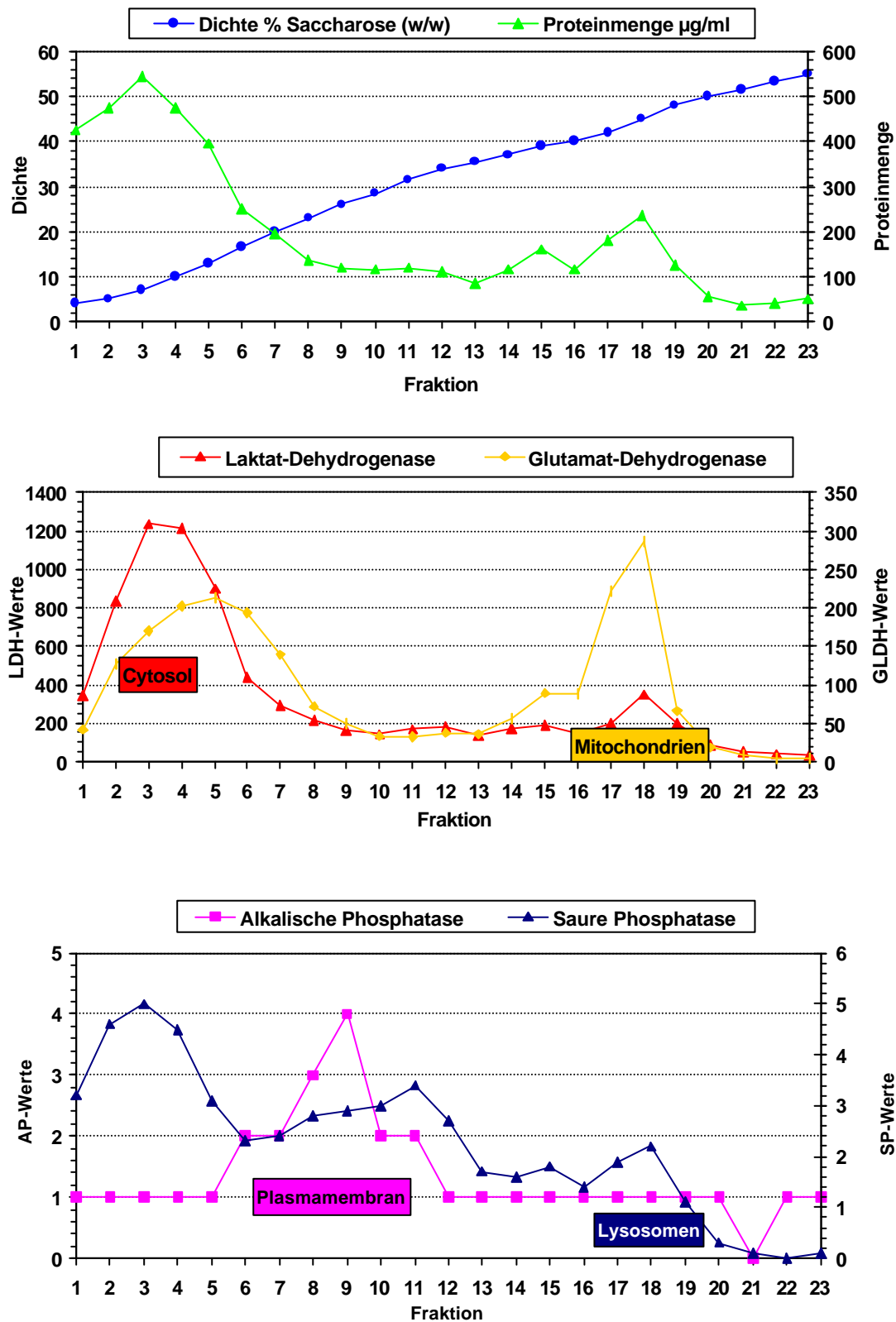


Abb. 3.11 Subzelluläre Fraktionierung von HepG2-Zellen. Es wurden 40 Maxi-Schalen (Kulturfläche $143,07\text{cm}^2$) mit konfluentem HepG2 Zellrasen homogenisiert und subzellulär fraktioniert.

Die subzelluläre Fraktionierung der porcinen Leber zeigt, dass die Hauptmenge an Protein in den Fraktionen 1-8 (Dichte 2-20% (w/w) Saccharose) zu finden ist. Im Bereich dieser Dichten befindet sich hauptsächlich das Cytosol mit dem Inhalt bzw. Fragmenten defekter Organellen. Ein zweiter Proteinpeak ist in den Fraktionen 20-25 (Dichte 41-48% (w/w) Saccharose) zu erkennen. In diesem Bereich sind Mitochondrien zu finden, die einen relativ großen Anteil des Gesamtproteins darstellen. Das Cytosol wurde durch die Dichtegradientenzentrifugation gut abgetrennt und ist in den Fraktionen 2-7 (Dichte 2,5-25% (w/w) Saccharose) enthalten. Die Glutamat-Dehydrogenase als Marker für Mitochondrien ist zwar auch in den Fraktionen 2-10 (Dichte 2,5-25% (w/w) Saccharose) zu finden, der Hauptpeak aber befindet sich in den Fraktionen 20-23 (Dichte 41-48% (w/w) Saccharose). Dieser Peak stimmt gut mit den Literaturwerten (Preparative Centrifugation; A Practical Approach; D. Rickwood) überein. Die Plasmamembran hat wie aufgrund von Literaturangaben zu erwarten ihren Hauptpeak im Bereich von 22-35% (w/w) Saccharose (Fraktion 9-15). Neben diesem Hauptpeak erkennt man noch zwei weitere Peaks am Anfang und am Ende des Gradienten. Die Hauptmenge an Lysosomen befindet sich in den Fraktionen 20-23. Auch hier erkennt man im Bereich niedriger Dichten ein Signal. Insgesamt stimmen die durch Markerenzyme erhaltenen Ergebnisse gut mit den Literaturwerten überein. Daher sind wahrscheinlich auch die anderen Organellen, welche nicht durch Markerenzyme bestimmt wurden, im Bereich ihrer laut Literatur charakteristischen Dichte zu finden. Endosomen und Plasmamembran können durch diese Dichtegradientenzentrifugation nicht voneinander getrennt werden.

Für die humane Leber zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie bei der porcinen Leber, wobei insgesamt weniger Leber eingesetzt werden konnte und dementsprechend auch die Werte der Markerenzyme sowie die Proteinmengen niedriger waren. Für HepG2-Zellen sind die Werte nochmals deutlich niedriger, die Verteilung der Kompartimente im Dichtegradienten stimmt aber auch hier gut mit den Ergebnissen der Auftrennung der porcinen Leber und der Literatur überein.

3.3 Spaltung von HBsAg-Filamenten durch hepatozelluläre Proteasen

Die einzelnen Hepatitis-B-Virus Hüllproteine werden unterschiedlich gut von Proteasen wie zum Beispiel Trypsin oder V8 gespalten. So ist das MHBs gegenüber Proteasen sehr sensitiv, während das SHBs von diesen Proteasen kaum gespalten wird. Um zu untersuchen inwieweit die Hüllproteine von hepatozellulären Proteasen gespalten werden, wurden die durch subzelluläre Fraktionierung gewonnenen Fraktionen auf ihre

proteolytische Aktivität gegenüber HBsAg- Filamenten getestet. Dazu wurden Fraktionen eines Gradienten auf gleiche Proteinmenge eingestellt und zu HBsAg- Filamenten gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde im ELISA mit monoklonalen Antikörpern gegen SHBs, MHBs und LHBs getestet inwieweit die einzelnen Hüllproteine von Proteasen gespalten wurden. Wird das Epitop des Antikörpers durch die Spaltung zerstört oder abgetrennt, so ist kein Signal im ELISA messbar. Als Negativkontrolle diente ein Versuchsansatz ohne Filamente (\cong 100% gespalten) und als Positivkontrolle ein Versuchsansatz ohne Zugabe von Protease (= 0% gespalten). Die proteolytische Spaltung wurde für porcine Leber bei pH 5 und pH 7,4 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.12-3.13 dargestellt.

Wurde der Verdau in einem neutralen Milieu von pH 7,4 durchgeführt, führen Fraktionen, die Plasmamembran und Endosomen enthalten, nicht zu einer Spaltung der Oberflächenproteine (Abb. 3.12). Nur Fraktionen die cytosolische oder lysosomale Proteasen enthalten, führen zur Spaltung der HBsAg-Proteine. Allerdings werden SHBs, MHBs und LHBs gleichermaßen von den Proteasen gespalten. Bei einem Inkubationsmilieu von pH 5 hingegen lassen sich Unterschiede in der Spaltung der einzelnen Hüllproteinen erkennen. Die Proteasen aus der Cytosol-Fraktion spalten wiederum alle Hüllproteine in etwa gleich gut. Die lysosomalen Proteasen spalten MHBs und LHBs etwas besser als SHBs. Die Fraktionen, die Plasmamembranen bzw. Endosomen enthalten, spalten das SHBs nahezu gar nicht, MHBs dagegen wird weitgehend gespalten. LHBs wird zwar gespalten, aber nicht so vollständig wie MHBs, sondern nur zum überwiegenden Teil (Abb. 3.13)

Dieser Versuch wurde mit fraktionierter humaner Leber wiederholt und ergab ein ähnliches Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Dagegen führten aus HepG2-Zellen gewonnene proteasehaltige Fraktionen zu einem anderen Spaltmuster (siehe Abbildung 3.14).

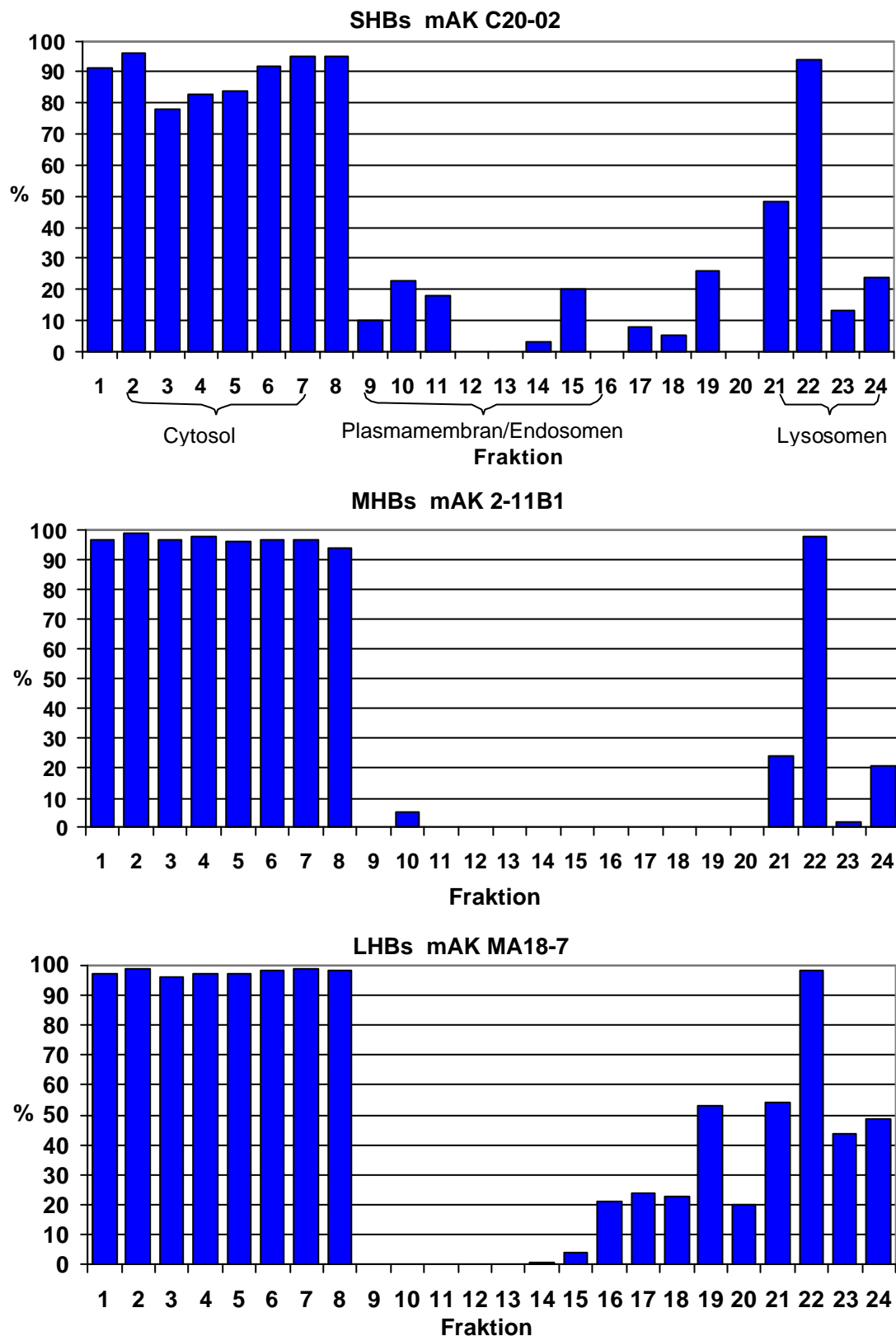


Abb. 3.12 Proteolytische Spaltung von HBsAg-Filamenten durch Proteasen aus porciner Leber. Inkubation des Verdaus ü.N., 37°C, pH 7,4 (Kontrolle ungespalten = 0%, gespalten =100%)

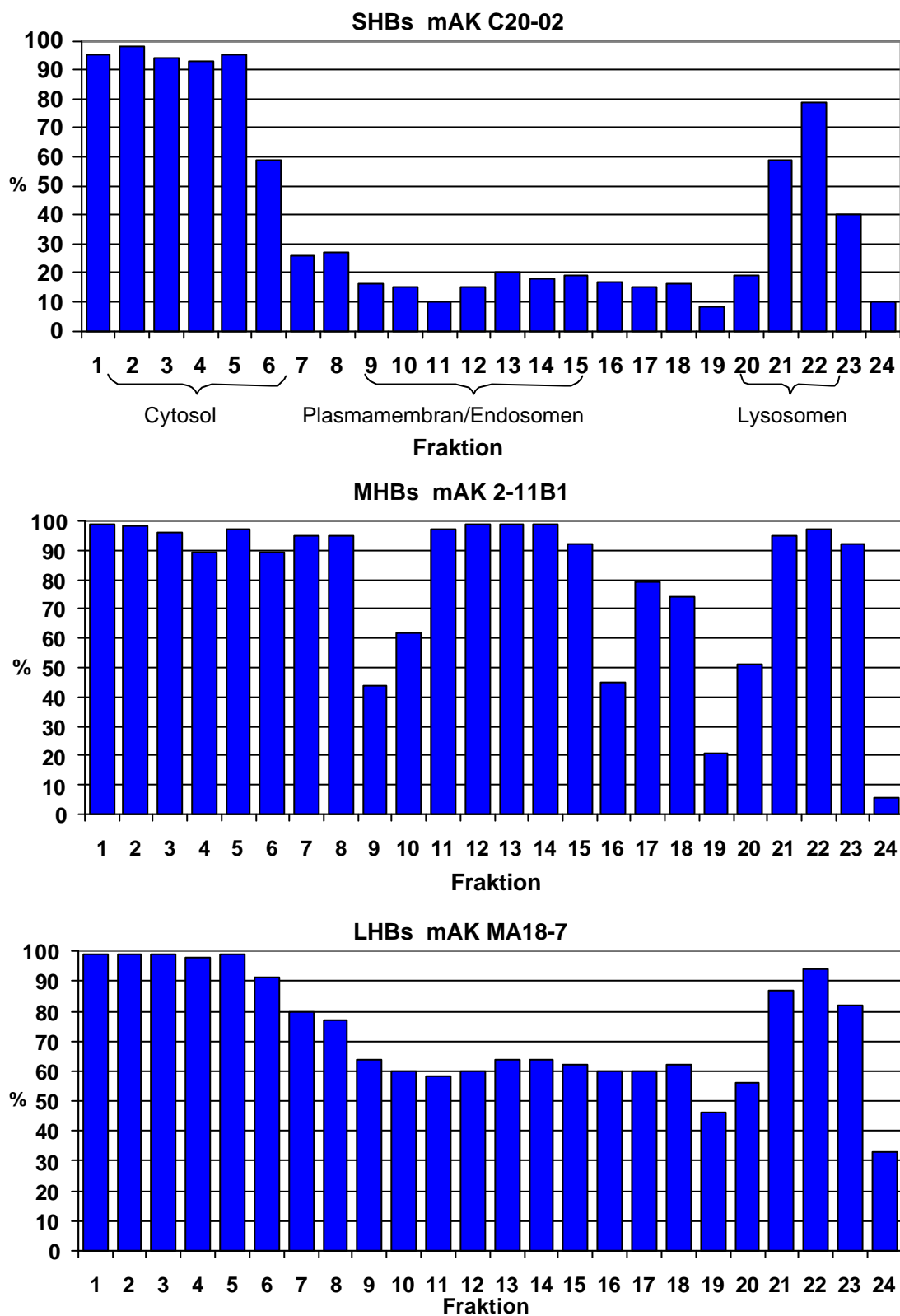


Abb. 3.13 Proteolytische Spaltung von HBsAg-Filamenten durch Proteasen aus porciner Leber. Inkubation des Verdaus ü.N., 37°C, pH 5 (Kontrolle ungespalten = 0%, gespalten =100%)

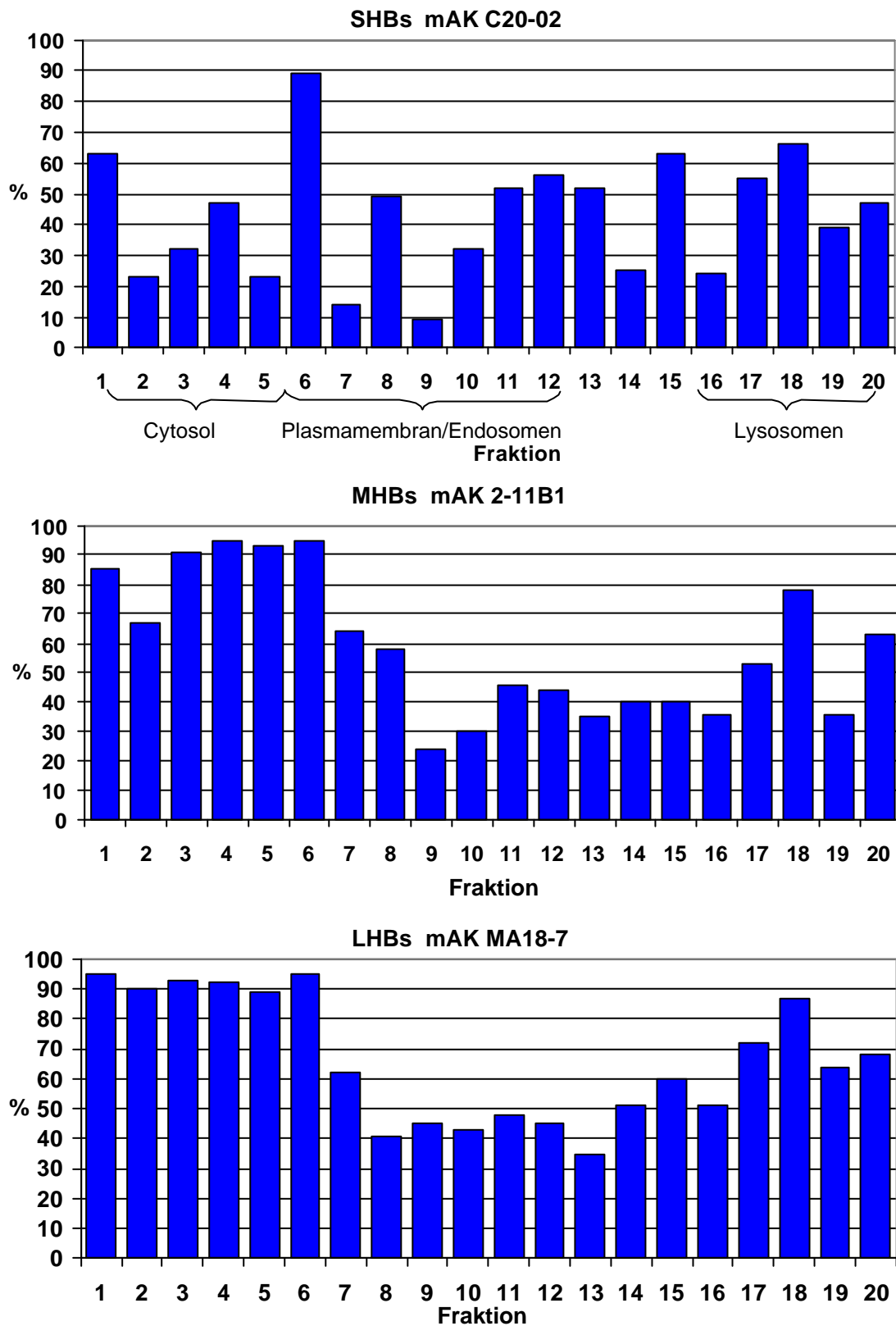


Abb. 3.14 Proteolytische Spaltung von HBsAg-Filamenten durch Proteasen aus HepG2-Zellen. Inkubation des Verdau ü.N., 37°C, pH 5 (Kontrolle ungespalten = 0%, gespalten =100%)

Bei den Proteasen aus HepG2-Zellen ist nur im Bereich des Cytosols und der Lysosomen eine deutliche Spaltung erkennbar, wobei die cytosolischen Fraktionen MHBs und LHBs besser spalten als SHBs. Die Plasmamembran/Endosomen-Fraktion spaltet die drei Hüllproteine gleichermaßen nur schwach.

Am wahrscheinlichsten ist eine Spaltung der Hüllproteine in vivo und eine damit verbundene Freisetzung einer Fusionssequenz in den Endosomen oder an der Plasmamembran der Zielzelle. Aus diesem Grund wurden für die weiteren Untersuchungen die Plasmamembran/Endosomen-haltigen Fraktionen eingesetzt. Nur diese Fraktionen führen, wenn sie aus frischer Leber gewonnen wurden, zu einem differenzierten Spaltmuster der Oberflächenproteine.

3.4 pH-Abhängigkeit der proteolytischen Spaltung

In dem zuvor beschriebenen Versuch wurde gezeigt, dass die Proteasen aus porciner Leber die Hüllproteine bei pH 5 besser spalten als bei pH 7,4. Im folgenden wurde die pH Abhängigkeit der Proteasen der Plasmamembran/Endosomen Fraktion nochmals genauer untersucht. Die Spaltung wurde bei pH 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7 und 7,4 durchgeführt. Dazu wurde die Plasmamembran/Endosomen Fraktion mit Filamenten bei entsprechendem pH über Nacht inkubiert und die Spaltung im ELISA nachgewiesen. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.15 dargestellt.

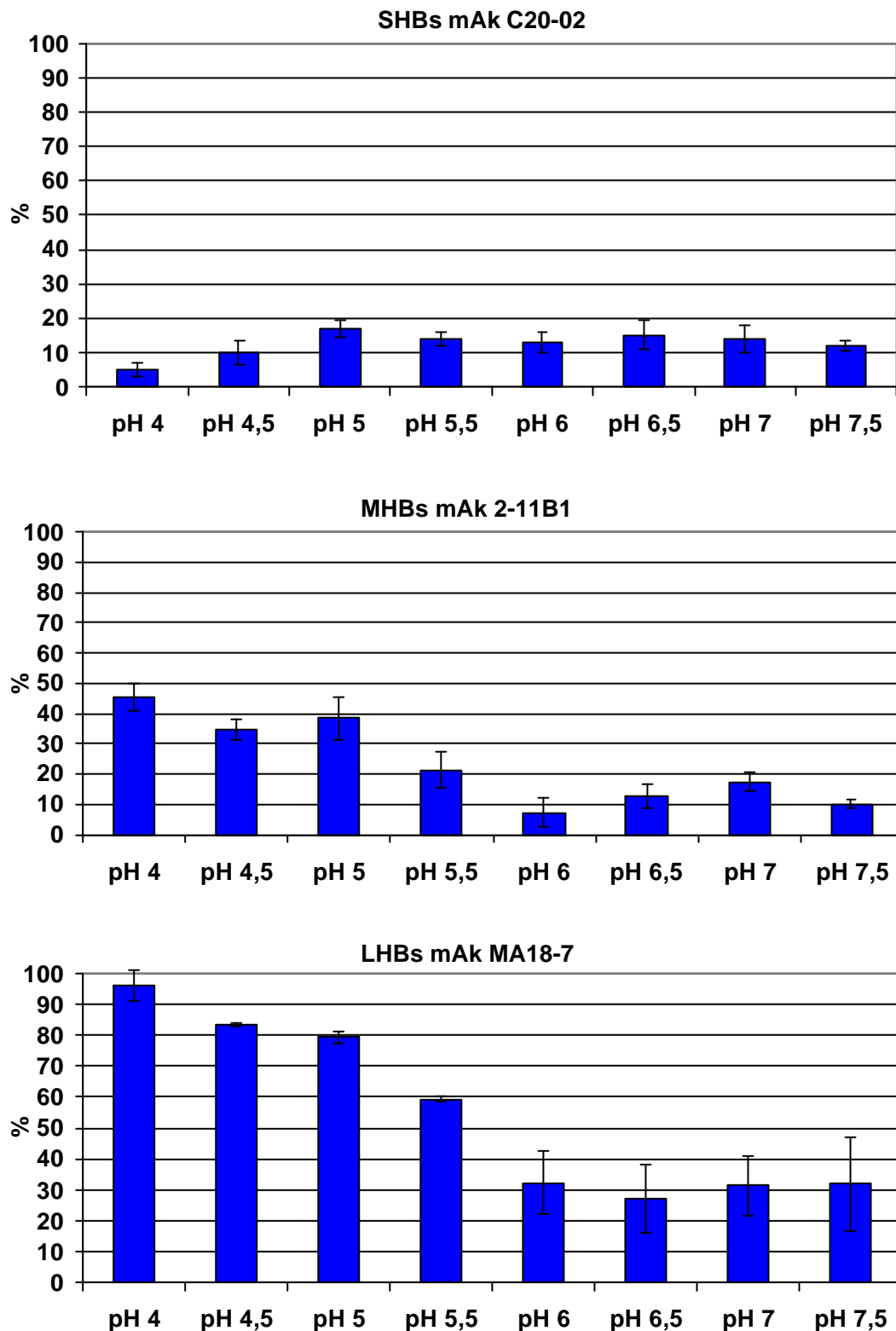


Abb. 3.15 Proteolytische Spaltung von HBsAg-Filamenten durch Proteasen aus porciner Leber bei verschiedenen pH-Werten. Plasmamembran/Endosomen Fraktion 12, Inkubation des Verdauens ü.N., 37°C ;(Kontrolle ungespalten = 0%, gespalten = 100%).

Wie nach dem unter 3.3 beschriebenen Versuch zu erwarten erkennt man im SHBs bei allen pH-Werten kaum Spaltung. In diesem Versuch ist aber auch die Spaltung des MHBs relativ gering. Für die Untersuchung wurde eine Probe verwendet, welche über einige Monate bei -20°C gelagert worden ist. Die Proben verlieren in dieser Zeit an Aktivität. Trotzdem lässt sich für MHBs und insbesondere für LHBs erkennen, dass die Spaltung bei pH 4 – pH 5,5 am besten ist und ab pH 6 deutlich abnimmt.

3.5 Proteolytische Spaltung mit und ohne Aufschluss der Organellen

In diesem Versuch wurde getestet, ob die proteolytische Aktivität der Plasmamembran/Endosomen Fraktionen durch Zugabe von Methanol gesteigert oder verringert wird. Proteasen die innerhalb der Endosomen vorliegen, könnten durch die Methanol Behandlung freigesetzt werden und so die proteolytische Aktivität erhöhen. Membrangebundene Proteasen der Plasmamembran oder der Endosomen aber könnten durch die Methanol Behandlung aus der Membran gelöst werden und dadurch ihre Aktivität verlieren. Der proteolytische Verdau wurde mit bzw. ohne Zugabe von Methanol über Nacht bei pH 5 durchgeführt. Es wurden gleiche Proteinmengen der Plasmamembran/Endosomen Fraktionen der subzellulären Fraktionierung von porciner und humaner Leber sowie den HepG2-Zellen eingesetzt. Die verwendeten Fraktionen (porcine Leber 12, humane Leber 11, HepG2-Zelle 9) entsprechen jeweils dem Peak der alkalischen Phosphatase und besitzen eine Dichte von 27-30% Saccharose (w/w). Die Spaltung der einzelnen Hüllproteine wurde im ELISA nachgewiesen.

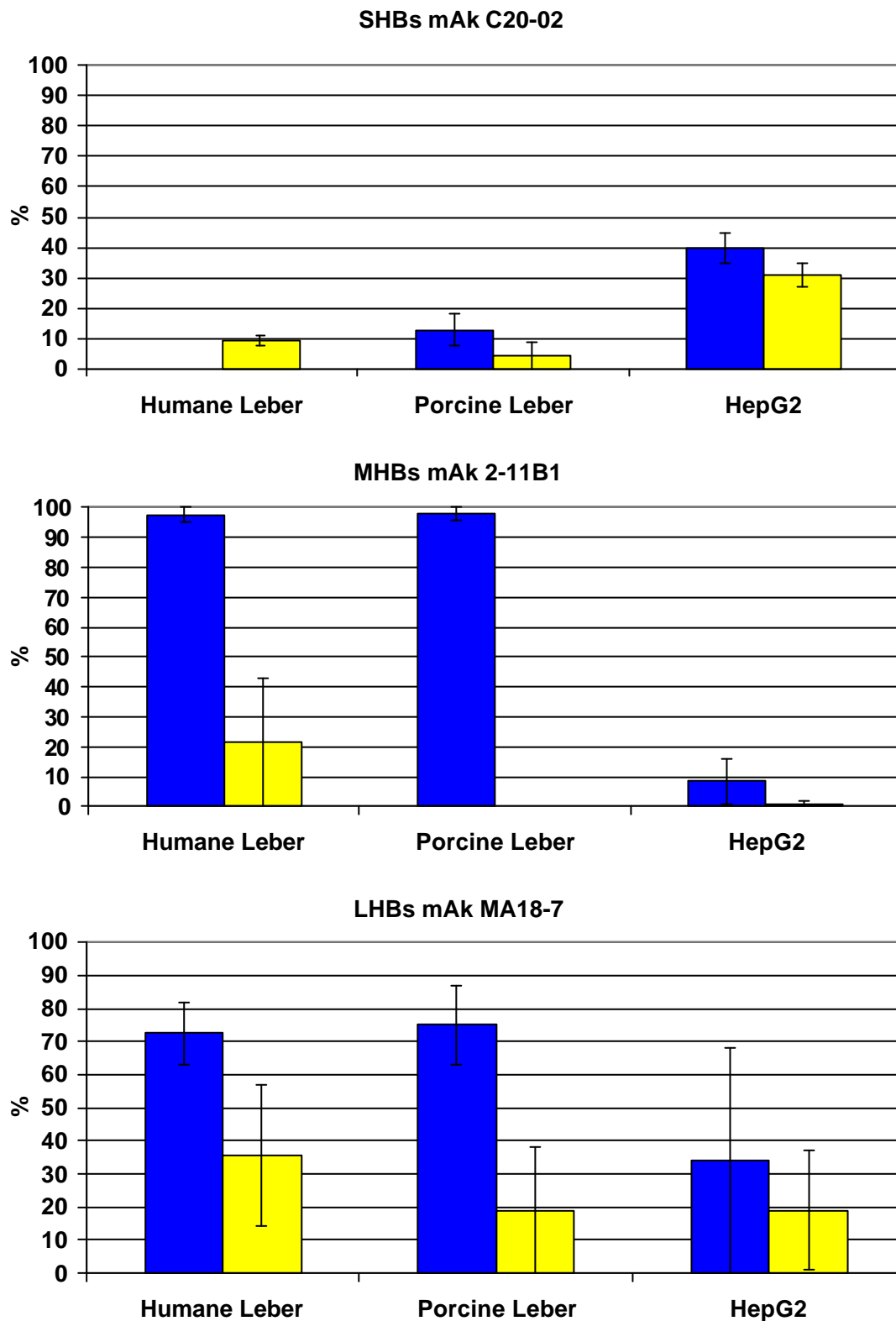


Abb. 3.16 Proteolytische Spaltung von HBsAg-Filamenten mit und ohne Aufschluß der Organellen durch Methanol. Inkubation des Verdau ü.N. 37°C, pH 5, Plasmamembran/Endosomen Fraktion: humane Leber Fraktion 11; porcine Leber Fraktion 12, HepG2 Fraktion 9 (Kontrolle ungespalten = 0%, gespalten = 100%) blau: ohne Aufschluss mit Methanol; gelb: Aufschluss mit 5% Methanol.

Die Zugabe von Methanol hatte keinen Einfluss auf den HBsAg-Nachweis in der unbehandelten Kontrolle (Daten nicht gezeigt), die Spaltung der Hüllproteine durch die Plasmamembran/Endosomen-haltigen Fraktionen wurde aber gehemmt. Am deutlichsten ist dies bei der Spaltung des MHBs durch Proteasen aus porciner und humaner Leber zu erkennen. Ohne Zugabe von Methanol wird das MHBs nahezu vollständig gespalten, mit Methanol kaum. Auch in diesem Versuch zeigt sich wieder ein Unterschied zwischen den Proteasen aus primärer Leber und Zellkultur. Die Proteasen der Plasmamembran/Endosomen-haltigen Fraktionen aus porciner und humaner Leber zeigen ein differenziertes Spaltmuster, ohne Zugabe von Methanol wird das SHBs kaum gespalten, das MHBs nahezu vollständig und das LHBs zu einem Großteil. Durch die Zugabe von Methanol wird die Spaltung der Hüllproteine inhibiert. Die Plasmamembran/Endosomen-haltige Fraktion aus HepG2-Zellen dagegen zeigt ein weniger differenziertes Spaltmuster. Die Hüllproteine werden insgesamt nur schlecht gespalten, wobei die Spaltung des MHBs hier am schwächsten ist. Die Behandlung mit Methanol hat auch auf die Proteasen aus HepG2-Zellen eine hemmende Wirkung. Da der Aufschluss mit Methanol die Proteaseaktivität negativ beeinflusst, wurde in den nachfolgenden Versuchen auf ihn verzichtet.

3.6 Konzentrationsabhängigkeit der proteolytischen Spaltung

Bei den bisher beschriebenen Versuchen wurden in der Regel 5 µg Gesamtprotein der subzellulären Fraktion auf 25 ng Filamente gegeben. Nun sollte getestet werden, ob geringere Mengen an Gesamtprotein das Spaltmuster verändern. Getestet wurden folgende Konzentrationen:

5 µg; 2,5 µg; 1,25 µg; 0,6125 µg; 0,306 µg Gesamtprotein der eingesetzten Fraktion / 25 ng HBsAg-Filamente

Die Versuche wurden mit der Plasmamembran/Endosomen Fraktion der subzellulären Fraktionierung der humanen Leber und der HepG2-Zellen durchgeführt.

Das Ergebnis ist in Abbildung 3.17 dargestellt.

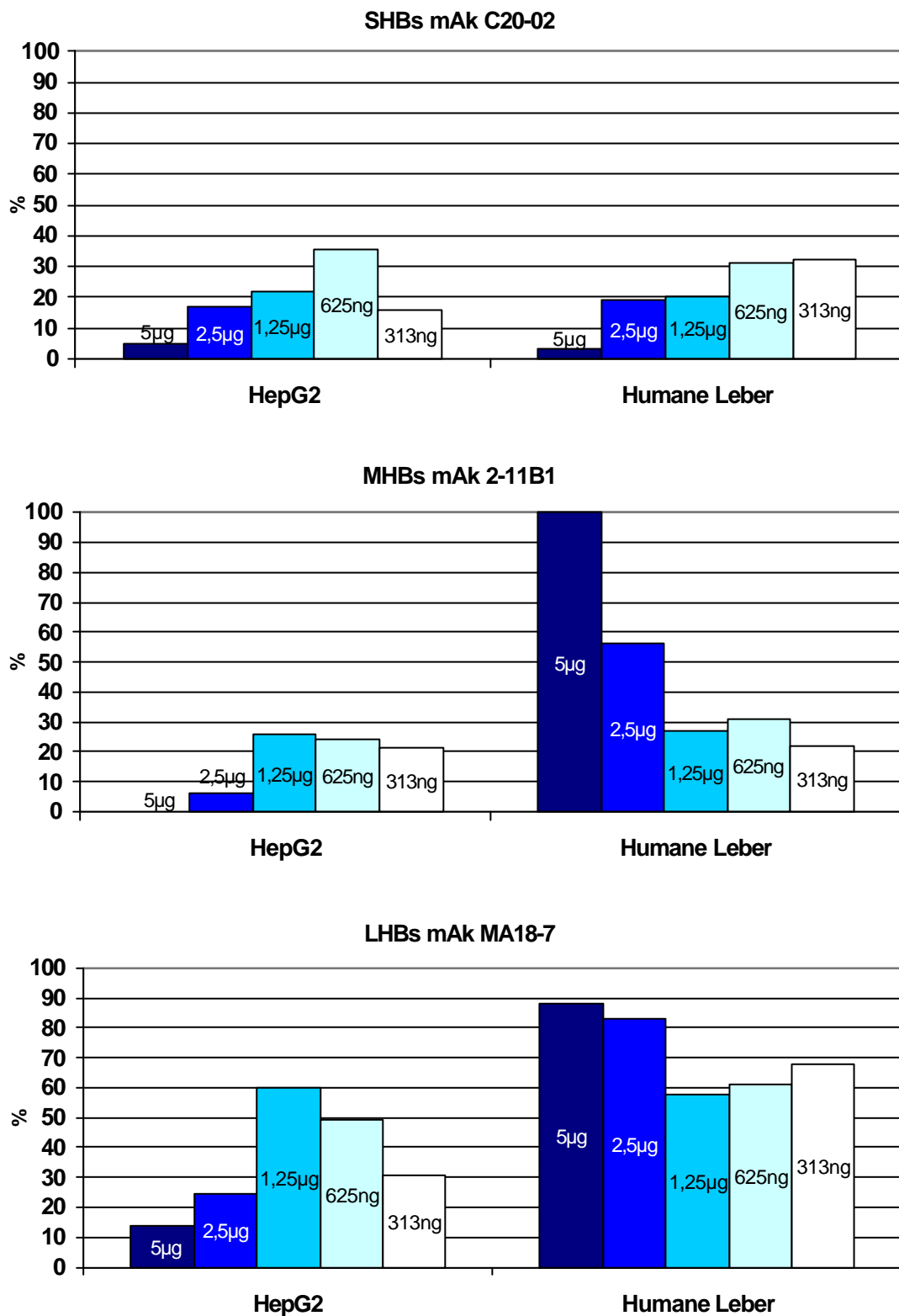


Abb. 3.17 Proteolytische Spaltung von HBsAg-Filamenten mit unterschiedlichen Konzentrationen an Plasmamembran/Endosomen Fraktion: HepG2 Fraktion 9; humane Leber Fraktion 11. Inkubation des Verdauers ü.N., 37°C, pH 5; (Kontrolle ungespalten = 0%, gespalten = 100%) µg Angaben = Gesamtprotein/ 25 ng HBsAg-Filamente.

Auch in diesem Versuch wird wieder der Unterschied im Spaltmuster zwischen Proteasen aus humaner Leber und HepG2-Zellen deutlich. Die Proteasen aus der Plasmamembran/Endosomen-haltigen Fraktion von HepG2-Zellen spalten die HBs Proteine vergleichsweise schlecht und zeigen keinen Unterschied in der Spaltung der einzelnen Hüllproteine. Von den Proteasen der Plasmamembran/Endosomen-haltigen Fraktion aus humaner Leber werden das MHBs und LHBs deutlich besser gespalten als das SHBs (siehe auch vorhergehende Versuche). Die proteolytische Aktivität von Proteasen aus HepG2-Zellen gegenüber HBsAg nimmt mit sinkender Proteinkonzentration paradoxerweise zunächst zu, dann allerdings wieder etwas ab. Für Proteasen aus humaner Leber zeigt sich ein anderes Bild, je weniger Protein eingesetzt wurde desto weniger wurde auch gespalten. In den nachfolgenden Versuchen wurden in der Regel mit einer Konzentration von 5 µg Protein/25 ng Filamente gearbeitet, da mit dieser Konzentration für Proteasen aus humaner Leber das beste Spaltmuster erzielt wurde.

In den nachfolgenden Versuchen sollte die Protease sowie die Schnittstelle der Protease genauer charakterisiert werden. Diese Versuche wurden nur mit den Proteasen der Plasmamembran/Endosomen-haltigen Fraktionen aus humaner und porciner Leber durchgeführt.

3.7 Inhibition der proteolytischen Aktivität

Um zu untersuchen welche Klassen von Proteasen an der Spaltung der Hüllproteine des Hepatitis-B-Virus beteiligt sind, wurden verschiedene Inhibitoren getestet. Folgende Inhibitoren wurden eingesetzt:

FKS (Fetales Kälberserum), inhibiert alle Endoproteinasen durch α 2-Makroglobulin; eingesetzte Konzentration 10%; Leupeptin, inhibiert alle Serin und Cystein-Proteinasen; eingesetzte Konzentration 2 mM; Aprotinin, inhibiert Serin-Proteasen; eingesetzte Konzentration 4 mM; EDTA, inhibiert Metalloproteasen; eingesetzte Konzentration 20 mM; Inhibitor Cocktail, inhibiert Serin- und Cystein-Proteinasen; eingesetzte Konzentration 5x. Alle Inhibitoren wurden nach Herstellerangaben im Überschuss zugesetzt. Der Versuch wurde mit Plasmamembran/Endosomen-Fraktionen aus humaner und porciner Leber durchgeführt. Die Probe wurde mit den Inhibitoren vorinkubiert und anschließend wurden HBsAg-Filamente zugegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Spaltung wurde mittels ELISA bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.18 dargestellt.

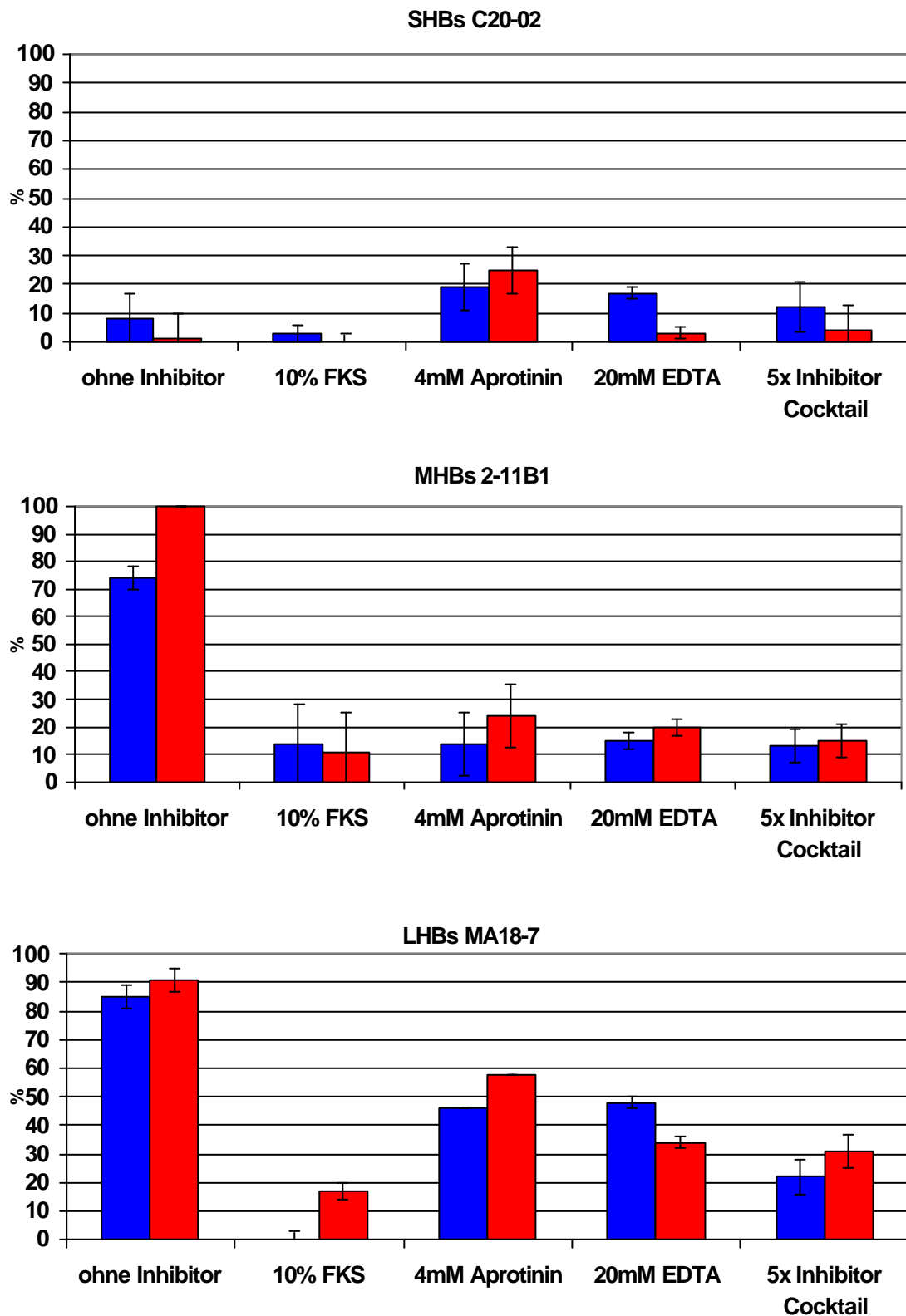


Abb. 3.18 Inhibition der proteolytischen Spaltung von HBsAg-Filamenten. Endosomen/Plasmamembran Fraktion; blau = Humane Leber Fraktion 11, rot = Porcine Leber. Fraktion 12. Inkubation des Verdau ü.N., 37°C, pH 5; (Kontrolle ungespalten = 0%, gespalten = 100%).

Man erkennt, dass alle eingesetzten Inhibitoren die proteolytische Aktivität der Proteasen der Plasmamembran/Endosomen Fraktion reduzieren. Der effektivste Inhibitor ist das FKS, welches über α 2-Makroglobulin alle Endoproteinasen inhibiert. Aber auch Aprotinin (Serin-Protease Inhibitor) und der Inhibitor Cocktail (Serin- und Cystein-Protease Inhibitor) zeigen deutliche Wirkung. Aber auch EDTA als Inhibitor für Metalloproteasen inhibiert die Spaltung.

3.8 Western Blot zur Charakterisierung der proteolytischen Spaltung

Aus den ELISA Ergebnissen lässt sich nur erkennen, dass das Epitop des verwendeten Antikörpers zerstört oder abgespalten wird. Um die Spaltstelle genauer zu charakterisieren wurde untersucht, ob vielleicht ein Spaltprodukt entsteht, welches das Antikörper-Epitop beinhaltet. Dazu wurde ein Western Blot durchgeführt. Der Versuchsansatz aus Protease und Filamenten und die Positivkontrolle wurde über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend in einem SDS-Polyacrylamid Gel aufgetrennt. Das Gel wurde auf eine PVDF-Membran übertragen, mit monoklonalen Antikörpern gegen SHBs, MHBs oder LHBs und anschließend mit einem Anti-Maus-Peroxydase Antikörper inkubiert. Zur Detektion wurde ein Chemilumineszenz Substrat verwandt. Der Blot ist in Abbildung 3.19 dargestellt.

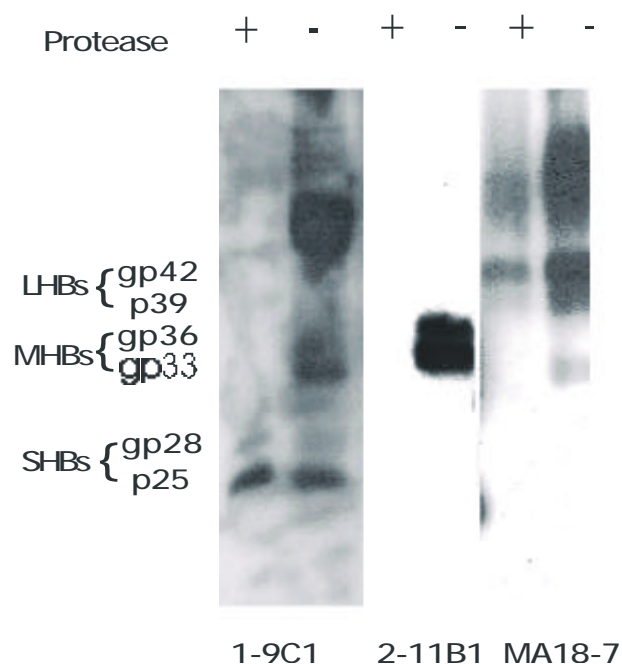


Abb. 3.19 Western Blot: Proteolytische Spaltung von HBsAg-Filamenten durch die Plasmamembran/Endosomen Fraktion 12 aus porciner Leber. Inkubation des Verdaus ü.N., 37°C, pH 5; (Kontrolle ungespaltene Filamente).

Im Western Blot lässt die unbehandelte Kontrolle das für die Hüllproteine typische Bandenmuster (SHBs p25, gp28, MHBs gp33; gp36, LHBs p39; gp42) erkennen. Das Spaltmuster bestätigt die Ergebnisse des ELISAs: SHBs wird kaum gespalten, MHBs dagegen ist vollständig gespalten, sodass im Blot kein Signal mehr zu detektieren ist und LHBs ist bei der mit Protease behandelten Probe deutlich schwächer als bei der Positivkontrolle. Auf keinem der drei Blotstreifen lassen sich Spaltprodukte, erkennen die das entsprechende Antikörper-Epitop besitzen und ein Abrutschen der Banden durch Abspaltung von kleinen Fragmenten lässt sich in diesem Blot ebenfalls nicht erkennen.

3.9 Kinetik der proteolytischen Spaltung

Bei den bisher beschriebenen Versuchen wurde der Ansatz aus protease-haltiger Fraktion und Filamenten stets über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit waren das MHBs und LHBs gespalten. Nun sollte getestet werden, wie lange die Protease mit den Filamenten inkubiert werden muß um ein optimales Ergebnis zu erhalten. Folgende Inkubationszeiten wurden getestet: 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h und über Nacht. Die Spaltung wurde mittels ELISA kontrolliert. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.20 dargestellt.

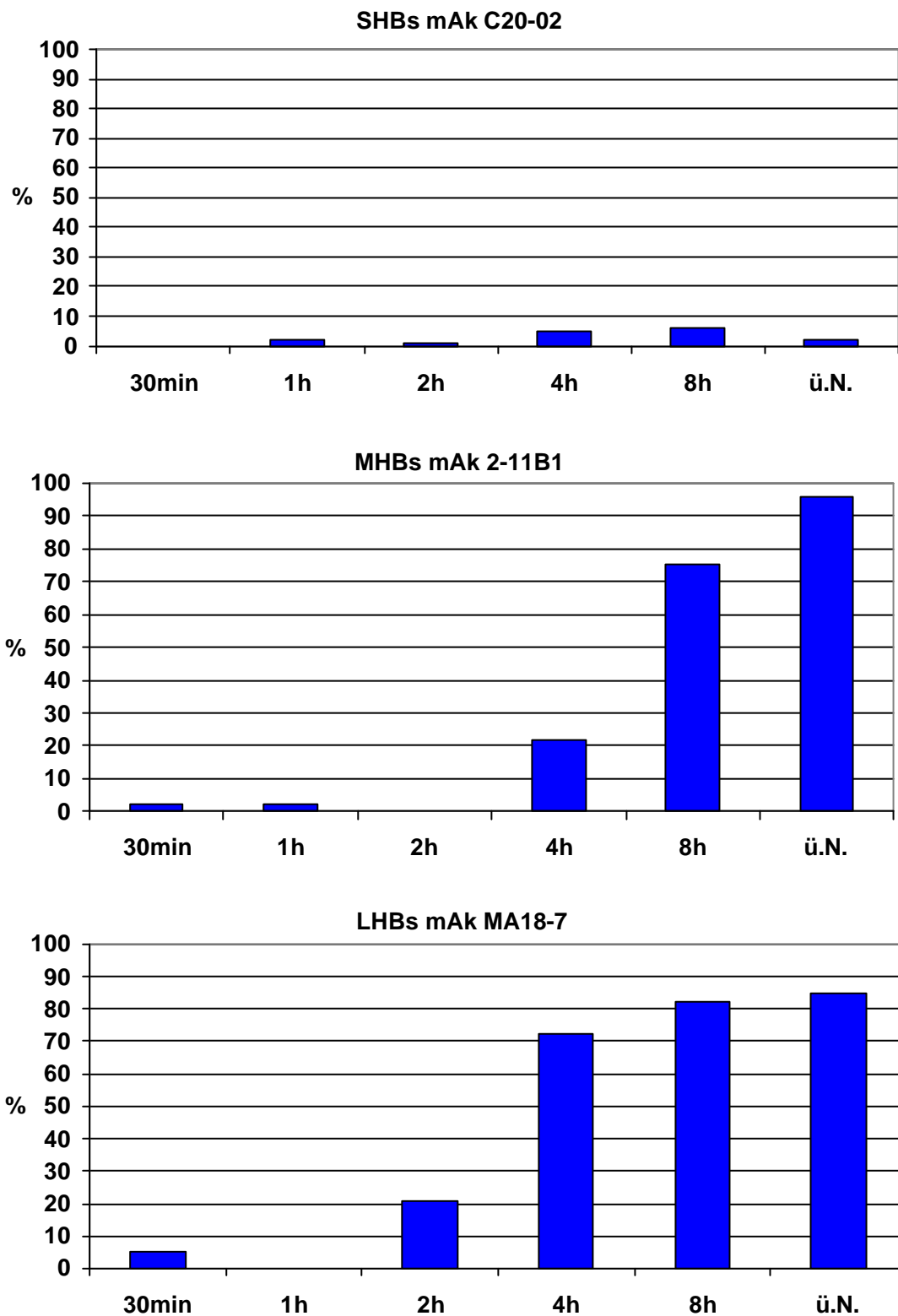
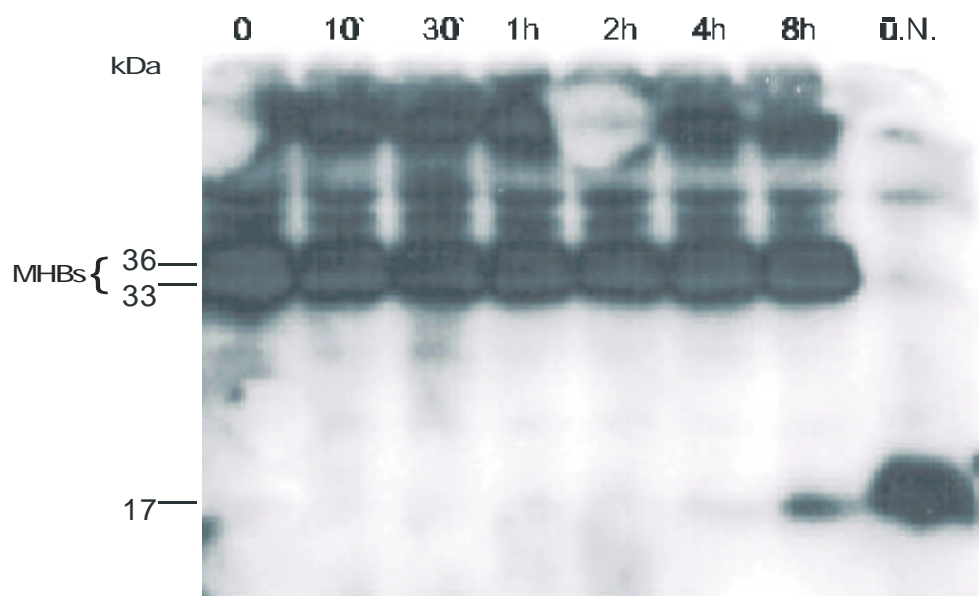


Abb. 3.20 Kinetik: Proteolytische Spaltung von HBsAg-Filamenten durch die Pasmamembran/Endosomen Fraktion 12 aus porciner Leber. Inkubation des Verdaus über entsprechende Inkubationszeiten, 37°C, pH 5; (Kontrolle ungespalten = 0%, gespalten = 100%).

Man erkennt, dass die Spaltung der Filamente eine lange Inkubationszeit benötigt, erst nach 2 h ist der Beginn der Spaltung erkennbar, für eine vollständige Spaltung des MHBs muss der Ansatz aber über Nacht inkubiert werden. Möglicherweise entsteht zunächst ein Spaltprodukt, welches bei längerer Inkubation weiter in kleine Fragmente gespalten wird. Aus diesem Grund wurde ein Western Blot mit Verdaus verschiedener Inkubationszeiten durchgeführt. Der Western Blot wurde wie unter 3.7 beschrieben mit der Plasmamembran/Endosomen Fraktion aus porciner Leber durchgeführt. Für die Detektion wurde der monoklonale MHBs Antikörper S26 verwendet, dessen Epitop einige Aminosäuren weiter carboxyterminal zu finden ist, als das des sonst verwendeten MHBs Antikörpers 211B1 (siehe Abbildung 3.23). Das Ergebnis ist in Abbildung 3.21 dargestellt.



MHBs Antikörper: S26

Abb. 3.21 Western Blot: Proteolytische Spaltung von HBsAg-Filamenten durch die Plasmamembran/Endosomen Fraktion aus porciner Leber. Inkubation des Verdaus über entsprechende Inkubationszeiten, 37°C, pH 5, kDa = Kilodalton

Im Western Blot erkennt man die für MHBs typischen gp33/36-kDa Banden und einige größere unspezifische Banden aus dem Leberextrakt. Diese Banden verschwinden erst nach Inkubation über Nacht. Nach 4 h und 8 h ist hier noch kaum eine Spaltung erkennbar, allerdings ist der Film überexponiert, sodass eine geringfügige Abnahme der Schwärzung nicht erkennbar ist. Neben den gp33 und gp36 kDa Banden erkennt man in der Höhe von 17 kDa eine Bande, die erst nach 4 h auftritt und nach Inkubation über Nacht ein starkes Signal ergibt. Da diese Bande also parallel zum Abbau des MHBs entsteht und vom MHBs Antikörper erkannt wird, schien es plausibel, dass es

sich bei der Bande um ein Abbauprodukt des MHBs handelt, welches das Epitop des Antikörpers S26 beinhaltet. Um zu untersuchen, ob diese Bande tatsächlich durch Spaltung des MHBs entsteht wurde ein weiterer Western Blot durchgeführt. Getestet wurden Versuchsansätze aus Filamenten und proteasehaltiger Fraktion, nur Filamente und nur proteasehaltiger Fraktion, jeweils vor und nach Inkubation über Nacht. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.22 dargestellt.

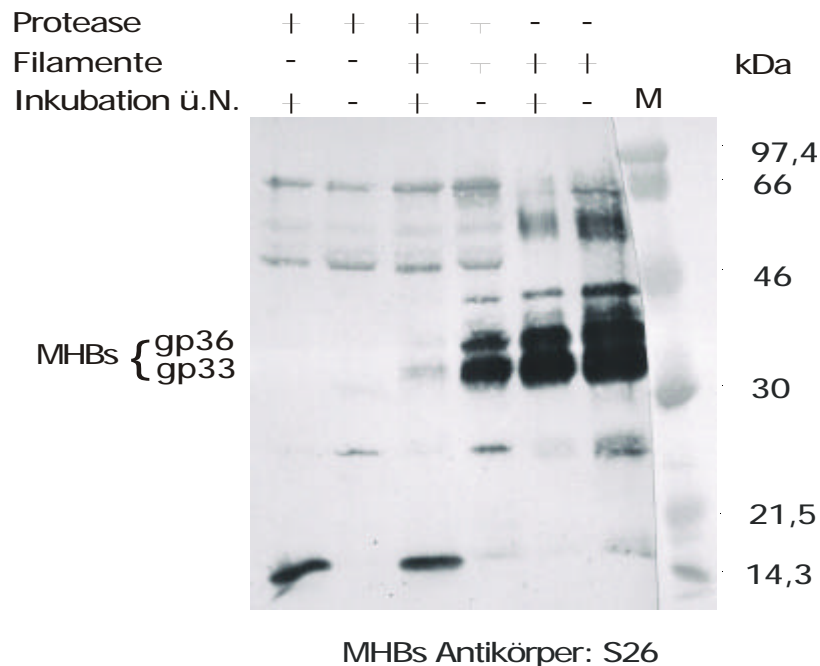


Abb. 3.22 Western Blot: Generierung der 17 kDa Bande. Kontrolle Filamente ohne Protease vor und nach Inkubation ü.N., 37°C, Protease und Filamente vor und nach Inkubation ü.N., 37°C und Protease ohne Filamente vor und nach Inkubation ü.N., 37°C. Protease = Plasmamembran/Endosomen-haltige Fraktion aus porciner Leber; M = Rainbow Marker (Amersham)

Es zeigte sich, dass die 17 kDa Bande auch bei dem Ansatz ohne Filamente nach Verdau über Nacht auftritt. Es kann sich daher nicht um ein Spaltprodukt des MHBs handeln sondern es ist ein Spaltprodukt aus porcinem Leberprotein, welches zufällig im gleichen Zeitraum generiert wird, in dem das MHBs gespalten wird und außerdem von dem MHBs Antikörper unspezifisch erkannt wird. Offensichtlich enthält die Membranfraktion ein Protein mit dem Epitop QDPR des Antikörpers S26, das erst nach Inkubation ein reaktives Fragment freisetzt.

3.10 Detektion der MHBs Schnittstelle für hepatozelluläre Proteasen

Die PräS2 Domäne des MHBs und LHBs ist die protease-sensitivste Stelle der Hüllproteine. Mit den bisherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass auch hepatozelluläre Proteasen diese Domäne gut spalten. Allerdings wurde die Detektion der gespaltenen Hüllproteine nur mit den Antikörpern S26 und 2-11B1 durchgeführt, die ihr Epitop am Aminoende der PräS2 Domäne besitzen (siehe Abb. 3.23). Um die Spaltung durch die Proteasen genauer charakterisieren zu können, wurde nun ein Western Blot mit zwei weiteren Antikörpern (2-12F2 und 1-9D1) durchgeführt, deren Epitope weiter carboxyterminal liegen (siehe Abb. 3.23). Der Western Blot wurde wie unter 3.7 beschrieben mit der Plasmamembran/Endosomen Fraktion aus porciner Leber durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.24 dargestellt.

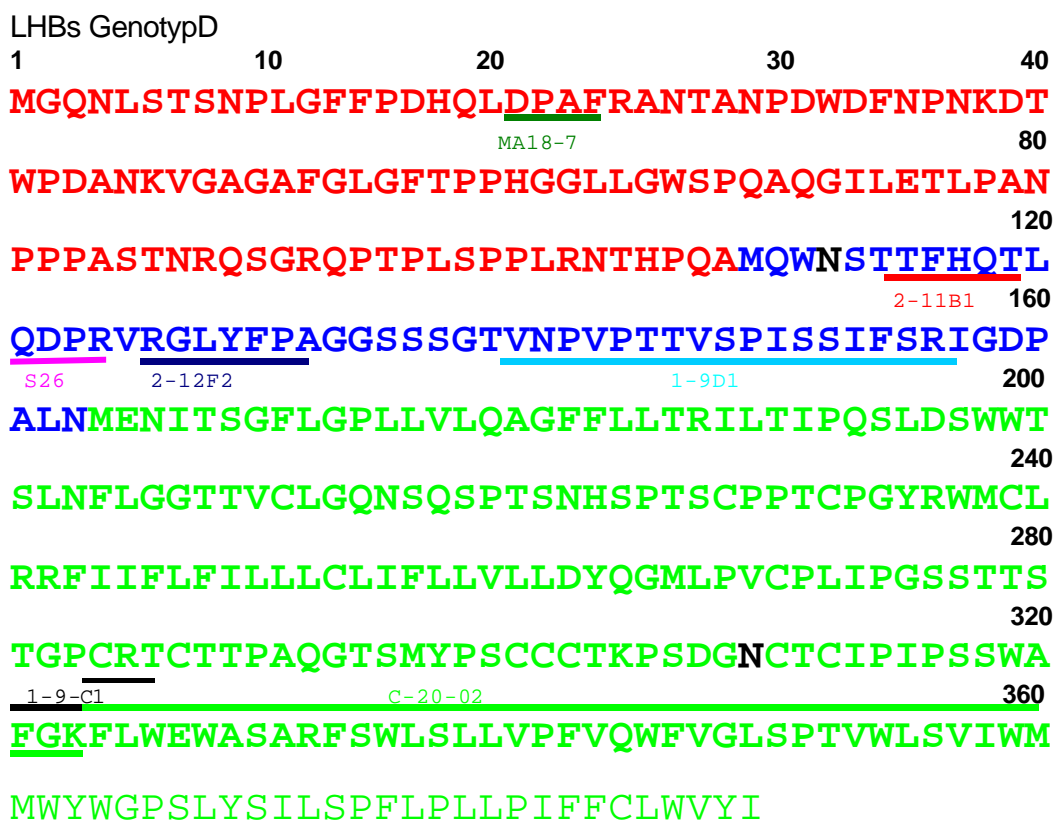


Abb. 3.23 Sequenz des LHBs Genotyp D. Grün S, Blau präS2, Rot präS1. Die Bindungsepitope monoklonaler Antikörper sind eingezeichnet (nach Sobotta et al, 2000). Schwarzes N = Glykosilierungstelle

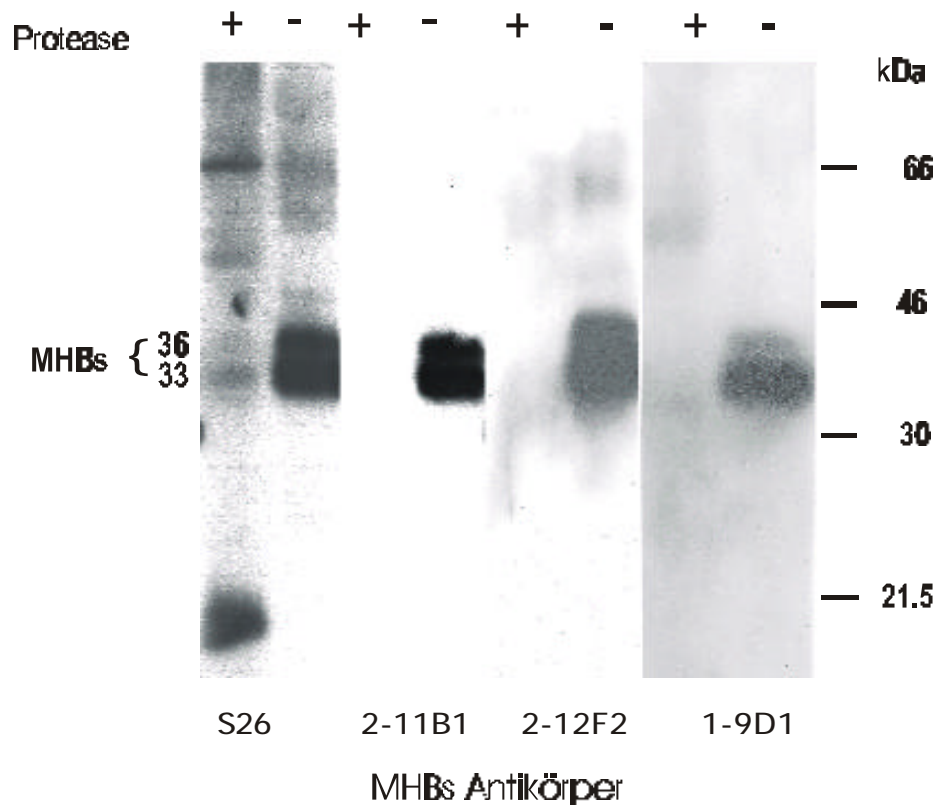


Abb. 3.24 Western Blot: Proteolytische Spaltung der PräS2 Domäne von HBsAg-Filamenten durch die Plasmamembran/Endosomen Fraktion 12 aus porciner Leber. Inkubation des Verdauung ü.N., 37°C, pH 5; (Kontrolle ungespaltene Filamente). Zur Bestimmung der Proteingröße wurde ein Größen Marker (Rainbow, Amersham) aufgetragen, kDa = Kilodalton

In der Kontrolle ohne proteasehaltige Fraktion ist das für MHBs charakteristische Bandenmuster von 33- und 36-kDa mit allen verwendeten Antikörpern zu erkennen. Der Antikörper S26 reagiert kaum mit der durch proteasehaltige Fraktion aus porciner Leber verdauten Proben. Die Bande im unteren Bereich dieser Blots bei etwa 17 kDa ist unspezifisch (vergleiche Abbildung 3.22). Wie in den vorherigen Versuchen ist auch mit dem Antikörper 2-11B1 keine Detektion eines Fragments in der verdauten Probe möglich. Auch die beiden weiteren MHBs Antikörper 2-12F2 und 1-9D1, deren Epitope weiter carboxyterminal liegen zeigen im Western Blot kein Signal bei den mit proteasehaltiger Fraktion verdauten Proben. Mit keinem der verwendeten Antikörper konnte ein Spaltprodukt, welches das jeweilige Antikörperepitop beinhalten, detektiert werden.

3.11 Interaktion von proteolytisch behandelten HBsAg-Filamenten mit HepG2-Zellen

In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob eine proteolytische Spaltung der HBsAg-Filamente zu einer verstärkten Bindung oder einer Aufnahme der Partikel durch die Hepatomzelllinie HepG2 führt. Dazu wurden HBsAg-Filamente mit Trypsin, V8 oder der protease-haltigen Plasmamembran/Endosomen Fraktion 12 der porcinen Leber verdaut und für verschiedene Inkubationszeiten auf HepG2-Zellen gegeben. Um das aufgenommene HBsAg detektieren zu können, wurden die Zellen durch Ultraschall aufgeschlossen. Im Sandwich ELISA wurde die Konzentration an gebundenem und aufgenommenen HBsAg bestimmt. Als Negativkontrolle diente unverdautes HBsAg. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.25-3.27 dargestellt.

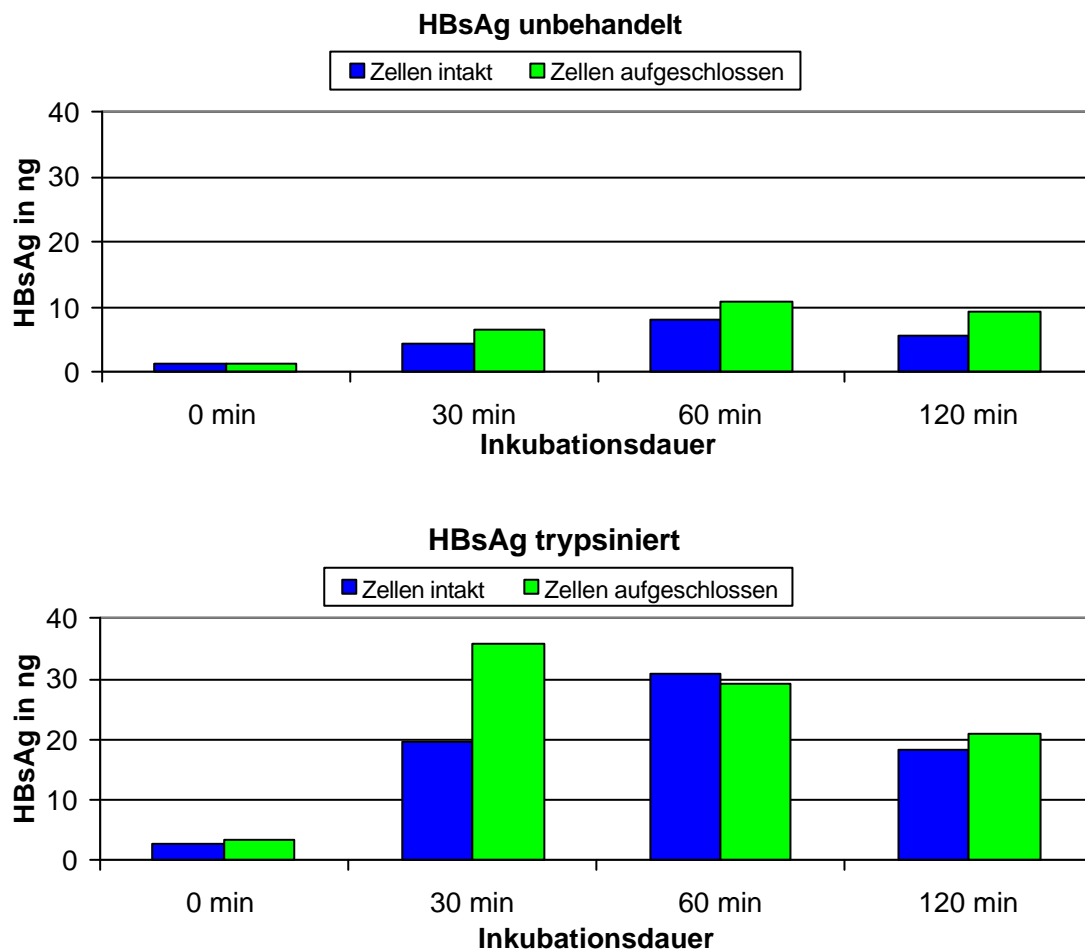


Abb. 3.25 Aufnahme/Bindung von Trypsin-verdaulichem HBsAg. Verdau von 50 µg HBsAg mit 1 µg Trypsin, 2 h, 37°C. 5 µg trypsiniertes HBsAg/Zellkulturschale HepG2-Zellen. Inkubation 37°C, Kontrolle unverdautes HBsAg

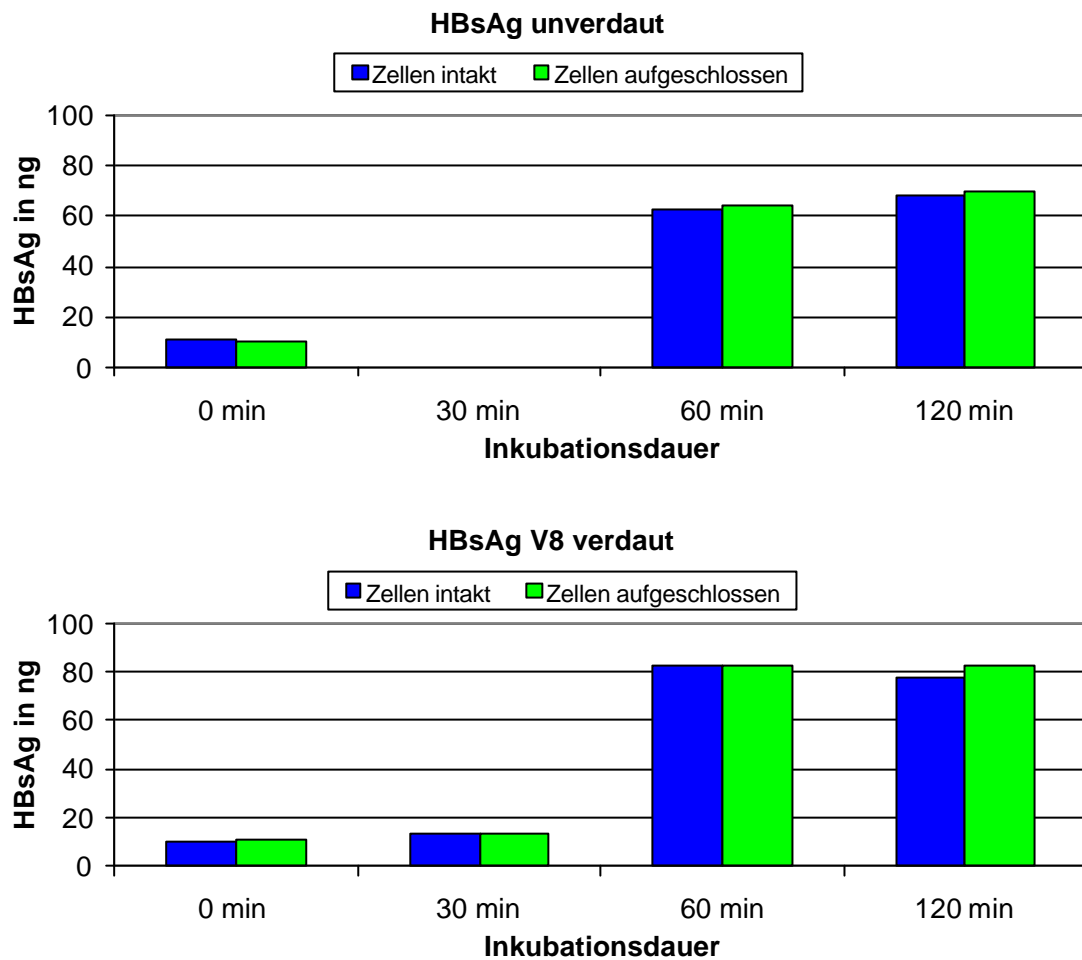


Abb. 3.26 Aufnahme/Bindung von V8-verdaulichem HBsAg. Verdau von 50 µg HBsAg mit 10µg V8 , ü.N, 37°C. 5 µg V8 verdautes HBsAg/Zellkulturschale HepG2-Zellen. Inkubation 37°C, Kontrolle unverdautes HBsAg

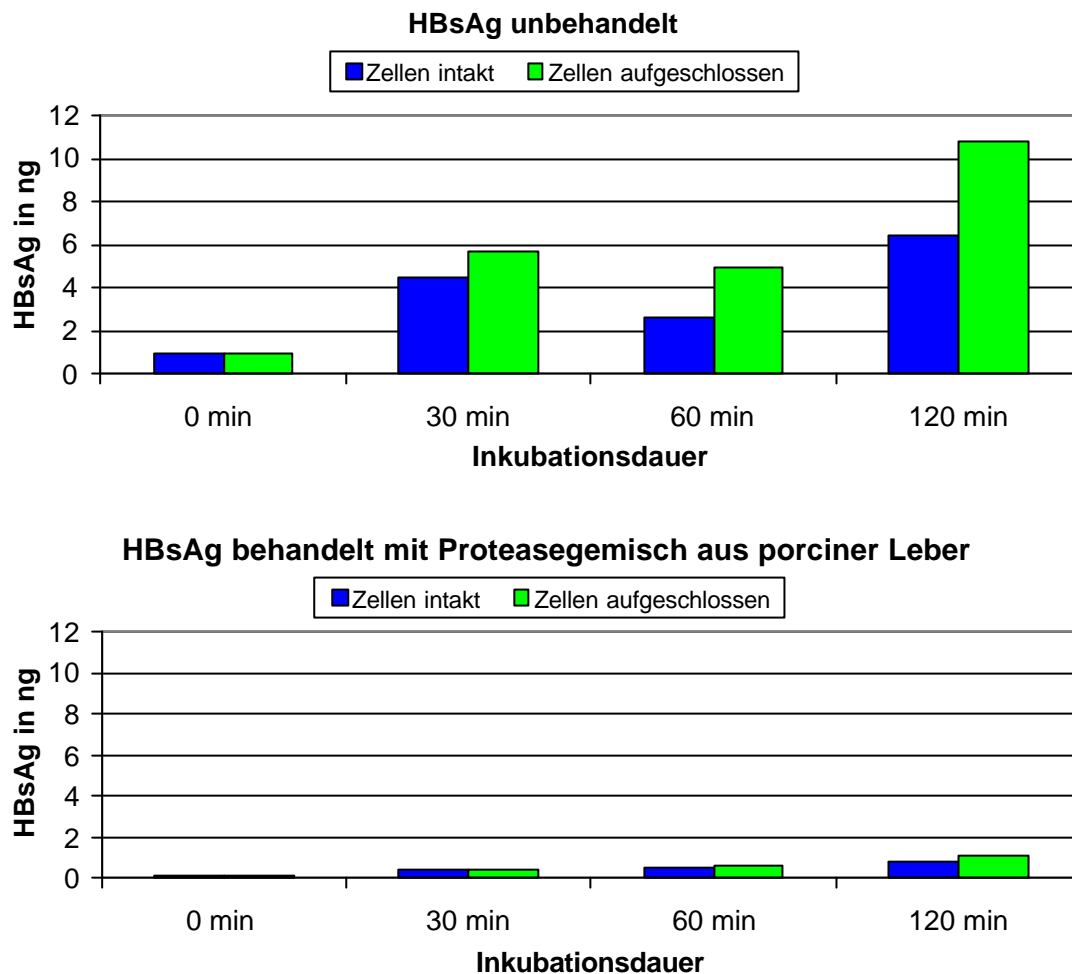


Abb.3. 27 Aufnahme/Bindung von porciner Protease-verdaulichem HBsAg. Verdau von 3,2 µg HBsAg mit 1,3 mg proteasehaltiger Plasmamembran/Endosomen Fraktion 12 aus porciner Leber, ü.N., 37°C. 800 ng verdautes HBsAg/ Zellkulturschale HepG2-Zellen. Inkubation 37°C, Kontrolle unverdautes HBsAg.

Trypsiniertes HBsAg bindet deutlich besser an die HepG2-Zelle als die unverdaute Kontrolle (Steigerung der gebundenen Menge an HBsAg um Faktor 3). Eine Aufnahme des HBsAg konnte aber weder bei der Kontrolle noch bei der trypsinisierten Probe beobachtet werden. Die HBsAg Konzentration der beschallten Zellen weicht nicht signifikant von den Werten der intakten Zellen ab. Nach 30 min ist bereits das Maximum an Bindung für trypsinisiertes HBsAg erreicht, die Kontrolle erreicht ihr Maximum erst nach 60 min. Mit V8-Protease zeigt sich ein im Prinzip ähnliches Bild. Auch hier wird durch die proteolytische Behandlung die Bindung an HepG2-Zellen verbessert, allerdings nur um Faktor 1,3. Durch Aufschluss mit Ultraschall kann nicht mehr HBsAg detektiert werden. Das mit porciner Protease verdaute HBsAg zeigt ein anderes Bindungsverhalten. Hier wird durch die Inkubation mit dem Leberextrakt die Menge an gebundenem HBsAg reduziert. Auch hier war kein signifikanter Effekt des Aufschlusses durch Ultraschall zu beobachten.

4 Diskussion

Die Hepatitis-B-Virus Hüllproteine spielen wahrscheinlich eine zentrale Rolle bei dem bis heute weitgehend ungeklärten Vorgang der Virusaufnahme in die Zielzelle und der Freisetzung des Kapsids. Möglicherweise ist eine proteolytische Spaltung der Hüllproteine von Bedeutung (Lu et al., 1996; Berting et al., 2000). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die proteolytische Spaltung der Hepatitis-B-Hüllproteine durch hepatozelluläre Proteasen untersucht. Nur primäre humane Hepatozyten lassen sich mit HBV infizieren, während primäre Hepatozyten anderer Spezies oder dedifferenzierte Hepatomzelllinien nicht infizierbar sind (Dissertation, D. Glebe, 2000). Daher stellte sich die Frage, ob sich die proteolytische Aktivität von humanen Leberzellen von der von porcinen Leberzellen oder von der der Hepatomzelllinie HepG2 unterscheidet und die Suszeptibilität der Zelle bedingt.

4.1 Reinigung von HBV-Partikeln

Im Serum HBV-infizierter Patienten befinden sich neben den infektiösen Viruspartikeln auch Sphären und Filamente, die nur aus Hüllprotein bestehen, aber kein Core und keine Nukleinsäure beinhalten. Aufgrund dieser Tatsache haben diese subviralen Partikel eine geringere Dichte als Viren. Filamente und Sphären unterscheiden sich in ihrer Größe und lassen sich durch Sedimentation im Dichtegradienten teilweise voneinander trennen. Die Reinigung der HBsAg-Filamente bestand aus vier Schritten: 1) Sedimentation im Saccharose-Dichtegradienten; 2) Cäsiumchlorid-Flotation; 3) erneute Sedimentation im Saccharose-Dichtegradienten; 4) Ultrafiltration.

Durch den ersten Schritt wurden die Viren und Sphären von den Filamenten abgetrennt. Filamente unterscheiden sich von den Sphären durch die Größe und den Gehalt an LHBs und konnten daher aufgrund der Position im Gradienten und der LHBs-Banden im Silbergel bestimmt werden. Sie bandierten bei 33-43% Saccharose, während die Sphären vorwiegend bei einer Dichte von 18-28% Saccharose zu finden waren. Größere Mengen an Serumprotein traten erst ab einer Dichte von 30% Saccharose auf, sodass die filamentreiche Fraktion nur mit geringen Mengen an Fremdprotein kontaminiert war. Bei dem kontaminierenden Fremdprotein handelt es sich hauptsächlich um Albumin und High Density Lipoprotein (HDL). Albumin wird zum Teil reversibel an die PräS2-Domäne des HBsAg gebunden (Machida et al., 1984). Durch die nachfolgende Cäsiumchlorid-Flotation konnte dieses Albumin entfernt werden. Ein anderer Teil bindet vermutlich irreversibel an das MHBs und lässt sich daher nicht abtrennen (Krone et al., 1990). Das HDL läuft im SDS Polyacrylamid Gel

auf gleicher Höhe wie das gp28 des SHBs und lässt sich daher nur schwer von diesem unterscheiden (persönliche Mitteilung W.H. Gerlich). Durch eine zweite Sedimentation im Saccharose-Dichtegradienten erhielt man Filamente die kaum noch Fremdprotein enthielten. Die abschließende Ultrafiltration diente der Entfernung der Saccharose und der Aufkonzentrierung der Filamente. Aus 19 ml Serum wurden 316 µg gereinigte Filamente gewonnen. Wie auf dem elektronenmikroskopischen Bild (siehe Abb. 3.8) deutlich wird, ließen sich die Filamente durch diese Reinigung nicht vollständig von Viren und Sphären trennen, sodass nur von einer filamentreichen Probe gesprochen werden kann. Dies ist aber kein Nachteil, weil es im wesentlichen auf eine LHBs-reiche Fraktion ankam, die ähnlich zur Virushülle sein sollte.

4.2 Subzelluläre Fraktionierung

Durch die subzelluläre Fraktionierung wurden die zellulären Komponenten voneinander getrennt, um so einzeln auf ihre proteolytische Aktivität untersucht werden zu können. Die Versuche wurden zunächst mit frischer porciner Leber durchgeführt, da diese leicht zu beschaffen ist und als Modell für die später verwendete humane Leber verwendet werden kann. Außerdem wurde die subzelluläre Fraktionierung mit Zellen der humanen Hepatomzelllinie HepG2 durchgeführt.

Durch Dichtegradienten-Zentrifugation wurde das Cytosol nahezu quantitativ von den Zellorganellen abgetrennt. Die Mitochondrien bandierten mit einem Peak bei einer Dichte von 41-48% Saccharose. Dieser Wert stimmt gut mit den Literaturwerten überein (Rickwood und Hames, 1992). Der zweite Peak bei einer Dichte von 2,5-25% Saccharose ist wahrscheinlich auf defekte Mitochondrien zurückzuführen. Auch die Plasmamembran und die Lysosomen zeigen neben ihrem charakteristischen Peak bei einer Dichte von 22-35% Saccharose für Plasmamembran und 40-50% Saccharose für Lysosomen Reaktionen der Enzymmarker bei niedrigen Dichten, die vermutlich auf defekte Organellen zurückzuführen sind. Der Peak der alkalischen Phosphatase bei einer hohen Dichte (40-50% Saccharose) lässt sich mit einer Kreuzreaktion von der Sauren Phosphatase und der Alkalischen Phosphatase erklären.

Die humane Leber und die HepG2-Zellen wurden in geringerer Menge eingesetzt als die porcine Leber, daher ist auch die Konzentration der Markerenzyme niedriger und damit die Stärke der Signale im Enzymtest. Es zeigte sich aber ein ähnliches Muster der Verteilung der Markerenzyme, sodass bei allen Aufreinigungen anhand der Markerenzyme und der Dichte die Fraktionen den einzelnen Organellen zugeordnet werden konnten.

Für Endosomen existiert kein leicht zu testender, nur für dieses Organell spezifischer biochemischer Marker (Rickwood und Hames, 1992), daher wurde ein ELISA gegen das endosomale Antigen Rab5 und EEA1 durchgeführt. Allerdings sind nur etwa 2% der Zellmasse Endosomen und die Markerproteine (EEA1, Rab5) sind in den Endosomen nur in geringer Menge vorhanden und bandieren in einem sehr breiten Dichtebereich, daher waren die Reaktionen im ELISA nur sehr schwach (Daten nicht gezeigt). Alle durch Markerenzyme bestimmten Organellen bandieren bei ihrer charakteristischen Dichte, daher kann man davon ausgehen, dass auch die Endosomen bei ihrer charakteristischen Dichte von 22-32% Saccharose zu finden sind. Plasmamembranen und Endosomen bandieren bei einer ähnlichen Dichte und lassen sich daher nur schwer voneinander trennen. Die in der Literatur beschriebenen Methoden zur Trennung dieser Organellen beruhen meist auf einer Veränderung der Dichte der Endosomen durch Aufnahme von leichten oder schweren Stoffen. Eine solche Aufnahme ist mit humanem oder porcinem Lebergewebe experimentell nicht durchzuführen. Auch Versuche, die Endosomen mit Antikörpern gegen beschriebene endosomale Antigene (EEA1, Rab5) zu identifizieren führten, wie bereits oben erwähnt, nicht zum Erfolg. Die Verteilung der Organellen auf bestimmte Dichten im Gradienten ist in allen Fraktionierungen deutlich zu erkennen. Für jedes Organell konnte bei etwa der gleichen Dichte ein charakteristischer Peak bestimmt werden. Bei der humanen Leber sind die Peaks für Mitochondrien und Lysosomen weniger deutlich ausgeprägt als bei porciner Leber. Vermutlich wurden bei der Homogenisierung der humanen Leber die Organellen stärker zerstört als bei porciner Leber, sodass hier im Verhältnis höhere Werte im Bereich des Cytosols zu erkennen sind.

4.3 Spaltung des HBsAg durch Proteasen aus humaner und porciner Leber

4.3.1 Proteolytische Aktivität der verschiedenen subzellulären Fraktionen gegenüber HBsAg-Filamenten

Die zellulären Kompartimente unterscheiden sich im Gehalt an Proteasen und auch in der Art der Proteasen. Durch die subzelluläre Fraktionierung wurden die einzelnen zellulären Organellen und das Cytosol voneinander getrennt und konnten daher einzeln auf ihre proteolytische Aktivität gegenüber HBsAg-Filamenten untersucht werden. Die Versuche wurden zunächst mit den Fraktionen der subzellulären Fraktionierung von porciner Leber durchgeführt und später zum Vergleich mit humaner Leber.

Am bedeutungsvollsten für den Infektionsweg des HBV ist wahrscheinlich eine Spaltung durch die Fraktionen, welche Plasmamembranen und Endosomen enthalten. Die Fusion von Viren mit der Zelle erfolgt nämlich entweder an der Plasmamembran oder in den Endosomen. In den Plasmamembran-/Endosomen-haltigen Fraktionen sind zwar deutlich weniger Proteasen zu finden als im Cytosol oder den Lysosomen, dennoch konnte eine deutliche Spaltung durch diese Fraktionen beobachtet werden. Allerdings erfolgte die Spaltung nur in leicht sauren Milieu (vergleiche Abb. 3.12 und 3.13). Die Proteasen zeigten dabei ein differenziertes Spaltmuster. Während MHBs- und LHBs-Epitope gut gespalten wurden, blieb das SHBs-Epitop intakt. Ein anderes Spaltmuster ergab sich mit der Lysosomen-haltigen und der Cytosol-haltigen Fraktion. Die Lysosomen besitzen eine hohe Konzentration an Proteasen und spalten daher das HBsAg besonders gut (sogar im neutralen Milieu). An der proteolytischen Spaltung des HBsAg im Infektionszyklus des HBV sind aber vermutlich weder die Lysosomen noch das Cytosol beteiligt. Die Cytosol-haltigen Fraktionen enthalten Bestandteile aller Organellen (siehe Abb. 3.9-3.11) und sind somit auch ein Gemisch verschiedenster Proteasen. Die Lysosomen als Teil des intrazellulären Netzwerkes aus Organellen und Vesikeln haben catabolische Funktion, die durch saure Proteasen vermittelt wird. In ihnen werden sowohl zelluläre Komponenten als auch extrazelluläres Material degradiert und prozessiert. Durch das saure Milieu und die hohe Konzentration an Proteasen würden die Viren in diesem Kompartiment vermutlich weitestgehend degradiert. Aus diesem Grund ist es für den Infektionszyklus des Hepatitis-B-Virus nicht wahrscheinlich, dass die proteolytische Spaltung und die damit verbundene Freisetzung des Kapsids im Lysosom erfolgt. Außerdem spalten die Lysosomen-haltigen Fraktionen die Epitope des SHBs, MHBs und LHBs gleichermaßen (siehe Abb. 3.12-3.13). Bei einer solchen vollständigen Spaltung würde die mögliche Fusionssequenz, die sich am Aminoende des SHBs befindet, vermutlich abgespalten. Die Cytosol-haltigen Fraktionen spalten ebenso wie die Lysosomen-haltigen Fraktionen alle Hüllproteine gleichermaßen, wobei anzunehmen ist, dass die cytosolischen Proteasen vorwiegend aus defekten Lysosomen stammen. Im Bereich des Cytosols sind Kontaminationen aller Proteasen zu finden, aus diesem Grund sind diese Fraktionen für die Untersuchung der proteolytischen Spaltung durch Proteasen eines bestimmten Kompartiments nicht geeignet.

4.3.1.1 pH-Abhängigkeit der proteolytischen Spaltung

Viele Viren, wie z.B. Influenzaviren, benötigen für die Aktivierung der Fusionssequenz eine Ansäuerung (Bullough et al., 1994). Der pH-Wert in Endosomen beträgt in etwa 5,3 (frühe Endosomen pH 6, späte Endosomen pH 5) und in den Lysosomen sinkt er bis auf pH 4 (Ohkuma et al., 1981). Aus diesem Grund wurde die proteolytische Aktivität der hepatozellulären Fraktionen gegenüber HBsAg bei verschiedenen pH-Werten untersucht.

Die Plasmamembran/Endosomen-haltige Fraktion aus porciner Leber spaltete die Hüllproteine bei Inkubation in saurem Milieu erheblich vollständiger, als im neutralen Milieu. Bei pH 6-7,4 wurde kaum gespalten, während bei pH 4-5,5 eine Spaltung des MHBs und LHBs zu beobachten war (siehe Abb. 3.15). Für die Spaltung ist also eine Ansäuerung notwendig. Bei pH 4 wird zwar gut gespalten, jedoch ist ein so niedriger pH nur in Lysosomen zu finden. Dort führt der saure pH zusammen mit den Proteasen zur Degradation der Proteine. Da die Hüllproteine des HBV aber sehr wahrscheinlich in den Endosomen oder an der Plasmamembran proteolytisch prozessiert werden, wurde ein etwas höherer pH-Wert für die Spaltung gewählt. Daher wurden die weiteren Versuche bei pH 5 durchgeführt, das entspricht einem pH-Wert im Übergang zwischen frühen und späten Endosomen.

4.3.1.2 Proteolytische Spaltung mit und ohne Aufschluss der Organellen

In Endosomen findet man sowohl gelöste als auch membrangebundene Proteasen, die möglicherweise in endosomalen Vesikeln eingeschlossen sind und daher im Versuchsansatz das HBsAg nicht spalten können. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die proteolytische Aktivität der Plasmamembran/Endosomen-haltigen Fraktion durch Aufschluß der Partikel gesteigert werden kann. Im Gegensatz zu Detergentien, welche ebenfalls als Aufschlussmittel getestet wurden, stört ein Aufschluss mit 5% Methanol den ELISA nicht (Daten nicht gezeigt). Ein solcher Aufschluß führte allerdings zu einer deutlich schwächeren Aktivität der Proteasen. Daher ist es wahrscheinlich, dass an der Spaltung des HBsAg membrangebundene Proteasen der Plasmamembran oder der Endosomenmembran beteiligt sind, welche durch die Methanolbehandlung ihre Aktivität verlieren. Ein weiterer Grund für die geringere proteolytische Aktivität könnten Proteasen sein, die durch die Methanolbehandlung freigesetzt werden und die andere Proteasen inhibieren oder verdauen. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Versuche auf einen Aufschluss der Organellen verzichtet.

4.3.1.3 Konzentrationsabhängigkeit der proteolytischen Spaltung

Von der Plasmamembran/Endosomen-haltigen Fraktion wurde nur die Proteinmenge, aber nicht der Gehalt an Proteasen bestimmt. Da der Proteasegehalt aber mit der Proteinmenge korreliert, wurden verschiedene Konzentrationen an Gesamtprotein auf HBsAg-Filamente gegeben und die Spaltungsaktivität im ELISA bestimmt. Um eine möglichst vollständige Spaltung zu erzielen, wurden die Plasmamembran/Endosomen-haltige Fraktion im Überschuss zugesetzt. Es zeigte sich, dass mit abnehmender Menge an Gesamtprotein die proteolytische Spaltung in der Regel abnahm. Bei einem Verhältnis von 5 µg Gesamtprotein/25 ng HBsAg-Filamente wurden das MHBs und das LHBs nahezu vollständig gespalten, während das SHBs intakt blieb. Daher ist dieses Konzentrationsverhältnis optimal. Auf die Spaltung des LHBs hatte die niedrigere Konzentration weniger Auswirkung als auf die von MHBs. Das LHBs wurde auch mit niedriger Konzentration an Gesamtprotein gut gespalten, während MHBs mit niedrigen Konzentrationen deutlich schlechter gespalten wird. Das LHBs wird also bevorzugt gespalten. Eine mögliche Erklärung wäre eine Protease, die in dem Gemisch in höheren Konzentration vorliegt und spezifisch das LHBs spaltet, während das MHBs möglicherweise durch eine andere Protease gespalten wird. Ein anderer Grund könnte die Topologie des LHBs sein. Das LHBs kann verschiedene Topologien annehmen (siehe Abb. 1.7). Neuere Daten von Grgacic und Schaller (2000) zeigen für das LHBs des Enten-Hepatitis-Virus, dass das LHBs im sauren Milieu seine Topologie ändert und sensitiv für Proteasen wird. Möglicherweise nimmt unter den sauren Milieubedingungen auch das humane LHBs teilweise eine solche Topologie an und wird dann bevorzugt von bestimmten Proteasen gespalten. Vielleicht liegt aber nur ein Teil des LHBs in dieser stark proteasesensitiven Form vor, sodass bei Vorhandensein eines Überschusses an Protease das MHBs noch vollständiger gespalten wird als das LHBs. Ein erstaunliches Bild zeigte sich im SHBs. Hier wird mit abnehmender Konzentration etwas besser gespalten, allerdings liegen die ELISA Werte alle in der Nähe der ungespaltenen Kontrolle, sodass es sich um Testungenauigkeiten handeln könnte. Eine weitere Erklärung könnten Proteasen sein, die sich in hoher Konzentration gegenseitig inhibieren.

4.3.1.4 Kinetik der proteolytischen Spaltung

Die proteolytische Spaltung durch reine Enzyme erfolgt in der Regel innerhalb weniger Minuten, so spaltet Trypsin das aminoterminal Ende des MHBs innerhalb von 10 min vollständig ab und nach 60 min ist das MHBs nahezu vollständig gespalten (Dissertation, D. Sobotta, 1999). Allerdings muss das HBsAg mit V8-Protease über Nacht inkubiert werden um eine vollständige Spaltung des MHBs zu erzielen (persönliche Mitteilung T. Tolle). Die Spaltgeschwindigkeit ist also stark von der verwendeten Protease abhängig. Eine Kinetik mit Proteasen der Plasmamembran/Endosomen Fraktion aus porciner Leber zeigte, dass ein vollständiger Verdau erst nach Inkubation über Nacht erfolgt (siehe Abb. 3.20 und Abb.3.21). Bei der eingesetzten Probe handelt es sich allerdings um ein Protease- und Protein-Gemisch, dessen Einzelbestandteile unbekannt sind. Die lange Inkubationszeit könnte durch die Art der Protease bedingt sein oder durch den Überschuss an zellulären Proteinen im Verhältnis zum HBsAg. In der Regel wurden 5 µg Protein/25 ng Filamente eingesetzt, also ein 200facher Überschuss an zellulärem Protein. Da die zellulären Proteine ebenso wie das HBsAg gespalten werden, dauert es relativ lange bis die Proteasen das gesamte HBsAg verdaut haben. Das LHBs wird zuerst gespalten, hier ist bereits nach 2 h eine Spaltung zu erkennen, während das MHBs erst nach 4 h gespalten wird und das SHBs auch nach Inkubation über Nacht noch intakt bleibt. Auch hier könnte das LHBs durch eine andere Protease gespalten werden als das MHBs, die eine höhere Spaltgeschwindigkeit besitzt als diejenigen, die das MHBs spaltet. Ein anderer Erklärungsansatz wäre, dass das LHBs aufgrund seiner Topologie, wie unter 4.3.1.3 beschrieben, zunächst bevorzugt gespalten wird. Das Ergebnis des Western Blots unterscheidet sich von dem des ELISAs. Ein vollständiges Verschwinden der MHBs Banden wird auch hier erst nach Inkubation über Nacht gesehen, allerdings ist nach 4 bzw. 8 h noch keine deutliche Abschwächung der Banden erkennbar. Hier wurde allerdings auch ein anderer Antikörper verwendet, dessen Epitop etwas weiter carboxyterminal liegt und daher vielleicht erst später abgespalten wird.

4.4 Inhibition der proteolytischen Spaltung

Es gibt verschiedene Klassen an Proteasen, die sich durch ihr aktives Zentrum unterscheiden. So kennt man Serin-Proteasen, Cystein-Proteasen, Aspartat-Proteasen und Metalloproteasen (Barrett et al., 1995). Die einzelnen Klassen lassen sich durch spezifische Inhibitoren hemmen. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal für Proteasen ist die Art der Spaltung, so unterscheidet man zwischen Endo- und Exoproteinasen.

Um die an der Spaltung der HBsAg-Filamente beteiligten Proteasen genauer zu charakterisieren wurden verschiedene Protease-Inhibitoren getestet. Der Inhibitor Pepstatin für Aspartat Proteinasen konnte nicht verwendet werden, da dieser nur in Alkohol löslich ist und die Zugabe von Alkohol, wie bereits gezeigt (siehe 4.3.1.2) zu einer Abschwächung der Proteaseaktivität führt. Getestet wurden die Plasmamembran-/Endosomen-haltigen Fraktionen, die vermutlich an der Prozessierung des HBV beteiligt sind. Als endosomale Proteasen beschrieben sind verschiedene Cystein-Proteasen, wie z.B. Cathepsin S und L (Chapman et al., 1998). Die Serin-/Cystein-Proteasen der Endosomen sind in einem breiten pH-Bereich aktiv, Aspartat-Proteasen, wie z.B. Cathepsin D, hingegen sind nur im stark sauren Bereich aktiv und daher nur in späten Endosomen und den Lysosomen zu finden (Blum et al., 1991). Auch Plasmamembran-ständige Proteasen wurden beschrieben, dabei handelt es sich hauptsächlich um Metalloproteasen. Sie haben sowohl katabolische als auch regulatorische Funktionen und sind so z.B. am Proteinprozessing beteiligt. Die Endopeptidase-24.11 (NEP), eine Zink-Metalloprotease, ist zum Beispiel am Prozessing und am Metabolismus von Neuropeptiden und Peptidhormonen beteiligt (Turner und Tanzawa, 1997).

Die beste Inhibition der proteolytischen Spaltung des HBsAg wurde mit FKS erzielt. FKS inhibiert die Proteasen über 2-Makroglobulin, einem Endoproteinase-Inhibitor. Auch Aprotinin (Serin-Protease Inhibitor) und der Inhibitor Cocktail (Serin-/Cystein-Protease Inhibitor) waren in der Lage die Spaltung zu inhibieren. Dies könnte ein Hinweis auf eine Serin-Endoproteinase sein, welche vielleicht ähnlich wie die V8-Protease spaltet. Allerdings konnte auch EDTA (Metalloprotease Inhibitor) die Spaltung inhibieren. Wahrscheinlich ist ein Gemisch aus verschiedenen Proteaseklassen an der Spaltung beteiligt.

4.5 Charakterisierung der Spaltstelle im MHBs

Mit Hilfe verschiedener Antikörper konnte gezeigt werden, dass die PräS2-Domäne des MHBs nahezu vollständig gespalten wird. Sowohl die Antikörper mit Epitopen im aminoterminalen Bereich wie 2-11B1 und S26 als auch die Antikörper 2-12F2 und 1-9D1, deren Epitope weiter carboxyterminal liegen zeigen im Western Blot kein Signal (siehe Abb. 3.24). Für die Freilegung der Fusionssequenz des HBV ist wahrscheinlich eine nahezu vollständige Spaltung notwendig, da die Fusionsdomäne sich am Aminoende des SHBs befindet und für die Aktivierung einer Fusionsdomäne in der Regel eine Spaltung in deren Nähe notwendig ist (Dissertation, A. Berting 1998). Im Western Blot ließen sich keine Spaltprodukte nachweisen, dies lässt sich durch eine

Spaltung der PräS2- Domäne in viele kleine, mit den eingesetzten Methoden, nicht detektierbare Fragmente erklären. Auch Trypsin spaltet die PräS2-Domäne in kleine Fragmente (Schmitt et al., 1999)

4.6 Vergleich der Proteasen aus humaner und porciner Leber

Die Experimente zur Bestimmung der optimalen Konzentration, die Kinetik, die Aufschlussbedingungen und auch die Inhibitionsuntersuchungen, sowie Western Blots wurden sowohl mit humaner als auch mit porciner Leber durchgeführt. Dabei zeigten die Proteasen aus porciner und humaner Leber stets ein ähnliches Spaltmuster: SHBs intakt, MHBs und LHBs gespalten. Es gab keinen Hinweis auf eine differierende Zusammensetzung der Proteasen, wie die Versuche mit Inhibitoren zeigten (siehe Abb. 3.18). Man kann also eine ähnliche Zusammensetzung an Proteasen in ihren Endosomen bzw. an der Plasmamembran annehmen.

Im Gegensatz zu primären humanen Hepatozyten welche mit HBV infiziert werden können, lassen sich primäre porcine Hepatozyten nicht infizieren. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente geben keinen Hinweis auf einen Unterschied zwischen Proteasen aus humaner und porciner Leber. Die fehlende Suszeptibilität der porcinen Leber für HBV ist also eher durch das Fehlen eines Rezeptors in der Plasmamembran der porcinen Hepatozyten zu erklären. Die Vorstellung ist die, dass das Virus zunächst an seinen Rezeptor (es können durchaus auch mehrere Rezeptoren sein) bindet und es nach Aktivierung der putativen Fusionssequenz im SHBs durch proteolytische Spaltung zu einer Fusion von Virusmembran und Zelle kommt.

4.7 Vergleich von Proteasen aus Lebergewebe mit Proteasen aus HepG2-Zellen

Im Gegensatz zu frischen humanen und damit differenzierten Hepatozyten lässt sich die dedifferenzierte Hepatomzelllinie HepG2 nicht mit HBV infizieren. Deshalb wurde postuliert, dass in diesen Zellen nicht die gleiche proteolytische Aktivität vorliegt wie in primären Hepatozyten (Lu et al., 1996). Es konnte gezeigt werden, dass die Cytosol- bzw. Lysosomen-haltigen Fraktionen der subzellulären Fraktionierung von HepG2-Zellen das MHBs und LHBs nahezu vollständig spalten, das SHBs, welches weniger proteasesensitiv ist, aber nur zum geringen Teil spalten (siehe Abb. 3.14). Die Plasmamembran/Endosomen-haltigen Fraktionen sind aber vermutlich für den Infektionszyklus des HBV wichtiger, da das Hepatitis-B-Virus vermutlich wie viele andere membranumhüllte Viren und auch das Enten-Hepatitis-Virus endosomal

aufgenommen wird. Im Endosom wird durch proteolytische Spaltung wahrscheinlich die Fusion mit der Endosomenmembran vermittelt. Aus diesem Grund ist die proteolytische Spaltung durch diese Fraktion besonders interessant. Im Gegensatz zu den Plasmamembran/Endosomen-haltigen Fraktionen aus Lebergewebe waren diese Fraktionen aus HepG2-Zellen nicht in der Lage die Hüllproteine differenziert zu spalten. SHBs, MHBs und LHBs wurden gleichermaßen unvollständig gespalten. Ein Aufschluss der Organellen mit Methanol führte auch bei den Proteasen aus HepG2-Zellen ebenso wie bei primären Hepatozyten zu einer Abschwächung der proteolytischen Aktivität. Für die Proteasen aus HepG2-Zellen konnte kein Konzentrationsverhältnis von proteasehaltiger Fraktion zu HBsAg-Filamenten gefunden werden, welches zu einem differenzierten Spaltmuster führt (siehe Abb. 3.17). Erstaunlich war, dass die proteolytische Aktivität gegenüber HBsAg mit abnehmender Gesamtproteinmenge der Plasmamembran/Endosomen-haltigen Fraktion zunächst zunahm. Dies lässt sich durch Proteasen erklären, welche sich in hoher Konzentration gegenseitig inhibieren oder spalten. Setzt man allerdings noch geringere Mengen an Protease ein so nimmt die proteolytische Aktivität ab. Die Proteasen reichen nicht mehr aus um das HBsAg zu spalten.

Die aus HepG2-Zellen gewonnenen Proteasen zeigen also eine Aktivität, die deutlich von der aus frischer Leber gewonnenen abweicht. Die HepG2-Zellen entstammen einem Leberkarzinom, daher ist es wahrscheinlich, dass diese Zelllinie ein verändertes Expressionsmuster zeigt. Häufig werden in Karzinomzellen bestimmte Proteasen vermehrt exprimiert, die zur Metastasierung beitragen, z.B. Kollagenasen (Duffy, 1996). Die recht gleichmäßige Zerstörung aller Hüllproteine durch Proteasen, die an Endosomen und/oder Plasmamembranen von HepG2-Zellen lokalisiert sind, ist wohl eine der Ursachen für die fehlende Suszeptibilität von HepG2-Zellen für HBV. Für eine Funktion müsste das Hüllprotein in der Nähe der Fusionsdomäne gespalten werden ohne degradiert zu werden. Daneben kann das Fehlen von Rezeptoren natürlich nicht ausgeschlossen werden.

4.8 Interaktion von proteolytisch behandelten HBsAg-Filamenten mit HepG2-Zellen

HepG2-Zellen sind nach allgemeiner Auffassung für die Infektion mit HBV nicht suszeptibel. Jedoch sind sie für die Replikation des HBV permissiv, d.h. nach Transfektion mit klonierten HBV-Genomen produziert diese Zelllinie HBV-Virionen sowie subvirale Partikel. Es kann daher postuliert werden, dass Teilschritte der Virusbindung und Aufnahme in dieser Zelllinie blockiert sind. Bisher konnten eine Reihe von Bindungspartnern identifiziert werden (vergleiche 1.10) deren Bedeutung im viralen Lebenszyklus jedoch noch ungeklärt ist. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass den HepG2-Zellen wahrscheinlich eine Protease fehlt, die das HBsAg differenziert spaltet und damit die putative Fusions-Domäne freisetzt. Um die fehlende Protease zu umgehen, wurde untersucht, ob die HepG2-Zellen in der Lage sind das HBsAg zu binden und aufzunehmen wenn die putative Fusionssequenz zuvor durch Proteasebehandlung freigelegt wurde. Es zeigte sich, dass das HBsAg nach Behandlung mit Trypsin ungefähr 3x so gut an HepG2-Zellen bindet, wie die unbehandelte Kontrolle (siehe Abb. 3.25). Auch die Behandlung mit V8-Protease führte zu einer verstärkten Bindung an die HepG2-Zellen (Faktor 1,3 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle; siehe Abb. 3.26). Eine gesteigerte Aufnahme war aber in beiden Fällen nicht zu beobachten. Das HBsAg bindet durch die proteolytische Behandlung also besser an die HepG2-Zellen, wird aber nicht endozytiert.

Mit dem Proteasegemisch aus der Plasmamembran/Endosomen-haltigen Fraktion aus porciner Leber konnte keine gesteigerte Bindung gezeigt werden (siehe Abb. 3.27). Die Bindung wurde im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle sogar noch gehemmt (Faktor 10 schwächer). Allerdings wurden hier auch nicht die gereinigten verdauten HBsAg-Filamente eingesetzt sondern ein Gemisch aus Proteasen und verschiedensten Proteinen. Das Protein/Protease-Gemisch wurde dabei in einem 400 fachen Überschuss im Verhältnis zu den eingesetzten Filamenten zugesetzt. Die Membranfraktion mit den Proteasen ist wahrscheinlich selbst Target für eine unspezifische Bindung des freigelegten Fusionspeptids, sofern es exponiert wird, und verhindert so eine Bindung an die HepG2-Zellmembran.

Die proteolytische Vorbehandlung führt wie gezeigt nicht zur Aufnahme von HBsAg. Aus diesen Versuchen lässt sich allerdings nicht schließen welche Teilschritte des Infektionszyklus blockiert sind. Es konnte nur gezeigt werden, dass das proteolytisch vorbehandelte HBsAg besser an die Zelle bindet, nicht aber ob es sich dabei um eine spezifische Bindung handelt. Der von Neurath et al. (1992) für HepG2-Zellen beschriebene Rezeptor (IL6) bindet im PräS-Bereich. Durch die proteolytische

Vorbehandlung wird der PräS-Bereich aber abgespalten, aus diesem Grund ist für die in diesem Experiment beobachtete Bindung der von Neurath gefundene Rezeptor nicht von Bedeutung. X. Lu konnte bereits früher zeigen, dass diese Bindung nicht Zelltyp spezifisch ist (nicht publiziert) und durch V8-Protease aktiviert wird. Die verstärkte Bindung wird vermutlich durch das freigelegte Aminoende mit der Fusionsdomäne der S-Domäne vermittelt. Allerdings kommt es nach dieser Bindung nicht zur Fusion und damit nicht zur Aufnahme. Möglicherweise fehlen der Zelllinie spezifische Rezeptoren oder Korezeptoren oder aber die Freilegung der Fusionssequenz darf erst im Endosom erfolgen und führt nur dort zu einer Fusion und Freisetzung des Kapsids, während für die Aufnahme das HBsAg ungespalten vorliegen muss. Eine zu frühe Aktivierung des Fusionspeptids führt bei Influenza oder Flaviviren zum Verlust der Infektiosität.

Für den Infektionsvorgang muss das Virus vermutlich über die PräS-Bereiche an die Zelle binden, für diese Bindung ist vermutlich ein Rezeptor sowie ein Korezeptor notwendig (vergleiche DHBV, Urban, 1998). Nach der Bindung werden die Viren vermutlich endozytiert und im Endosom erfolgt dann im sauren Milieu die proteolytische Abspaltung der PräS-Bereiche und die Freisetzung der Fusionssequenz. Es folgt die Verschmelzung der Virushülle mit der Endosomenmembran und die Freisetzung des Kapsids ins Cytosol.

5 Zusammenfassung

Über die frühen Schritte im Infektionszyklus des Hepatitis-B-Virus ist bisher noch wenig bekannt. Es gibt jedoch Hinweise, dass eine proteolytische Spaltung der Oberflächenproteine von Bedeutung sein könnte. In dieser Arbeit wurde die proteolytische Spaltung der HBV-Hüllproteine durch hepatozelluläre Proteasen untersucht. Für die Untersuchung wurden die in großem Überschuss vorhandenen HBsAg-Filamente, die aus den viralen Hüllproteinen bestehen, verwendet. Diese wurden durch mehrere Reinigungsschritte von den Viren und Sphären, sowie von kontaminierenden Fremdprotein aus HBV-Trägerplasma weitgehend abgetrennt.

Frisches Lebergewebe sowie HepG2-Zellen wurden durch Zonal-Zentrifugation subzellulär fraktioniert. Anhand von Dichte und Markerenzymen wurden die Fraktionen bestimmt, welche ein bestimmtes Organell (Lysosom, Plasmamembran, Mitochondrien) bzw. das Cytosol bevorzugt enthielten. Die Verteilung der Organellen im Dichtegradienten sowie die Abtrennung des Cytosols war sowohl für humane wie porcine Leber als auch für HepG2-Zellen ähnlich.

Die HBV-Hüllproteine wurden durch die Lysosomen-, die Cytosol- und die Plasmamembran/Endosomen-haltigen Fraktionen der subzellulären Fraktionierung von Leber gut gespalten. Die Cytosol- und die Lysosomen-haltigen Fraktionen spalteten die drei Hüllproteine (SHBs, MHBs, LHBs) gleichermaßen, während die Plasmamembran/Endosomen-haltigen Fraktionen zu einem differenziertem Spaltmuster führten: SHBs blieb weitgehend intakt, MHBs und LHBs wurden gespalten. Eine solche Spaltung durch die Plasmamembran/Endosomen-haltigen Fraktionen war allerdings nur im sauren Milieu zu beobachten. Für HepG2-Zellen wurden keine Bedingungen gefunden, unter denen die Proteasen der Plasmamembran/Endosomen-haltigen Fraktionen zu einem differenzierten Spaltmuster führten. Alle drei Hüllproteine wurden stets nahezu gleichermaßen schlecht gespalten. Die HepG2-Zellen scheinen also andere Proteasen zu beinhalten als die frischen Leberzellen. Das Fehlen einer differenzierten Spaltung könnte einer der Gründe für die fehlende Suszeptibilität der HepG2-Zelllinie für HBV sein.

Durch Versuche mit Protease-Inhibitoren konnte die an der Spaltung beteiligte Proteaseklasse nicht eindeutig bestimmt werden, da vermutlich ein Gemisch verschiedener Proteaseklassen beteiligt ist.

Immunoblot-Versuche mit verschiedenen Antikörpern gegen das MHBs zeigten, dass die PräS2-Domäne des MHBs nahezu vollständig gespalten wird. Durch eine solche Spaltung des MHBs könnte die Fusionsdomäne am Aminoende des SHBs freigesetzt und aktiviert werden.

6 Literaturverzeichnis

- Aden, D.P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I. und Knowles, B.B. (1979). *Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line.* Nature **282**: 615-616.
- Albin, C. und Robinson, W.S. (1980). *Protein Kinase Activity in Hepatitis B Virus.* J.Virol. **34**: 297-302.
- Almeida, J.D., Rubinstein, D. und Stott, E.J. (1971). *New antigen-antibody system in Australia-antigen-positive hepatitis.* Lancet **II**: 1225-1227.
- Ashwell, G. und Harford, J. (1982). *Carbohydrate-specific receptors of the liver.* Annu. Rev. Biochem. **51**: 531-554.
- Aufiero, B. und Schneider, J. (1990). *The hepatitis B virus X-gene product trans-activates both RNA polymerase II and III promoters.* EMBO J. **9**: 497-504.
- Bancroft, W.H., Mundon, F.K. und Russell, P.K. (1972). *Detection of additional determinants of hepatitis B antigen.* J. Immunol. **109**: 842-848.
- Bartenschlager, R. und Schaller, H. (1988). *The amino-terminal domain of the hepadnaviral P-gene encodes the terminal protein (genome-linked protein) believed to prime reverse transcription.* EMBO J. **7**: 4185-4192.
- Barrett, A.J., Rawlings, N.D. und Woessner, J.F. (1995). *Handbook of proteolytic enzymes.* Academic Press
- Beasley, R.P. und Hwang, L.Y. (1984). *Epidemiology of hepatocellular carcinoma.* In: Vyas, G.N., Dienstag, J.L. und Hoofnagle, J.H. (Hrsg.). Viral Hepatitis and Liver Disease, Grune & Stratton, Orlando: 209-224.
- Berting, A., Hahnen, J., Kröger, M. und Gerlich, W.H. (1995) *Computer-aided studies on the spatial structure of the small hepatitis B surface protein.* Intervirology **38**: 8-15.
- Berting, A. (1998). *Untersuchungen der Signalsequenz I im S-Protein des Hepatitis B Virus.* Dissertation an der JLU Gießen, Fachbereich Biologie.
- Berting, A., Fischer, C., Schaefer, S., Garten, W., Klenk, H-D., und Gerlich, W.H. (2000). *Hemifusion activity of a chimeric influenza virus hemagglutinin with a putative fusion peptide from hepatitis B virus.* Virus Research **68**: 35-49
- Bichko, V., Pushko, P., Dreilina, D., Pumpen, P. und Gren, E. (1985). *Subtype ayw variant of hepatitis B virus. DNA primary structure analysis.* FEBS Lett. **185**: 208-12
- Blum, J.S., Fiani, M.L. und Stahl, P.D. (1991). *Localization of cathepsin D in endosomes: characterization and biological importance.* Structure and Function of the aspartic proteinases. Plenum Press, New York.
- Blumberg, B.S., Gerstley, B.J., Hungerford, D.A, London, W.T. und Sutnick, A.I. (1967). *A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis.* Ann. Intern. Med. **5**: 924-931.
- Bock, C.T., Schranz, P.C.H. und Zen., Schröder, tgraf, H. (1994). *Hepatitis B virus genome is organized into nucleosomes in the nucleus of the infected cell.* Virus Genes **8**: 215-229.
- Böttcher, B., Wynne, S.A. und Crowther, R.A. (1997). *Determination of fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy.* Nature **386**: 88-91.

- Bosch, V., Bartenschlager, R., Radziwill, G. und Schaller, H. (1988).** *The duck Hepatitis B-virus P-gene codes for protein strongly associated with the 5' end of the viral DNA minus strand.* Virology **166**: 475-485.
- Breiner, K.M., Urban, S. und Schaller, H. (1998).** *Carboxypeptidase D (gp180), a golgi-resident protein, functions in the attachment and entry of avian hepatitis B viruses.* J. Virol. **72**: 8098-8104.
- Breiner, K.M. und Schaller, H. (2000).** *Cellular receptor traffic is essential for productive duck hepatitis B virus infection.* J. Virol. **74**: 2203-2209.
- Breddam, K. und Meldal, M. (1992).** *Substrate preferences of glutamic-acid-specific endopeptidases assessed by synthetic peptide substrates based on intramolecular fluorescence quenching.* Eur. J. Biochem. **206**: 103-107.
- Brown, M.S. und Goldstein, J.L. (1979).** *Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**: 3330-3337.
- Bruss, V. und Ganem, D. (1991a).** *The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**: 1059-1063.
- Bruss, V. und Ganem, D. (1991b).** *Mutational analysis of hepatitis B surface antigen particle assembly and secretion.* J. Virol. **65**: 3813-3820.
- Bruss, V. und Gerlich, W.H. (1988).** *Formation of transmembraneous hepatitis B e antigen by cotranslational in vitro processing of the viral precore protein.* Virology **163**: 268-275.
- Bruss, V., Lu, X.Y., Thomssen, R. und Gerlich, W.H. (1994).** *Post-translational alterations in transmembrane topology of the hepatitis B virus envelope protein.* EMBO J. **13**: 2273-2279.
- Bruss, V. und Thomssen, R. (1994).** *Mapping a region of the large envelope protein required for hepatitis B virion maturation.* J. Virol. **68**: 1643-1650.
- Bruss, V. und Vieluf, K. (1995).** *Functions of the internal pre-S domain of the large surface protein in hepatitis B virus particle morphogenesis.* J. Virol. **69**: 6652-6657.
- Bu, G und Schwartz, A.L. (1994).** *Receptor-mediated endocytosis.* In: The liver: biology and pathology. Third edition. Aras, I.M., Boyer, J.L., Fausto, N., Jakoby, W.B., Schlachter, D.A. und Shafitz, D.A. Raven press, Ltd, New York.
- Budkowska, A., Quan, C., Groh, F., Bedossa, P., Dubreuil, P., Bouvet, J.P. und Pillot, J. (1993).** *Hepatitis B virus (HBV) binding factor in human serum: candidate for a soluble form of hepatocyte HBV receptor.* J. Virol. **67**: 4316-4322.
- Budkowska, A., Maillard, P., Theret, N., Groh, F., Possehl, C., Topilko, A. und Crainic, R. (1997).** *Activation of the envelope proteins by a metalloproteinase enables attachment and entry of the hepatitis B virus into T-lymphocyte.* Virology **237**: 10-22.
- Budkowska, A., Bedossa, P., Groh, F., Louise, A. und Pillot, J. (1995).** *Fibronectin of human liver sinusoids binds hepatitis B virus: identification by an anti-idiotypic antibody bearing the internal image of the pre-S2 domain.* J. Virol. **69**: 840-848.
- Bullough, P.A., Hughson, F.M., Skehel, J.J. and Wiley, D.C. (1994).** *Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membran fusion.* Nature **371**: 37-43
- Carrasco, L. (1994).** *Entry of animal viruses and macromolecules into cells.* FEBS Lett. **350**: 151-154.

- Cattaneo, R., Will, H., Hernandez, N. und Schaller, H. (1983).** *Signals regulating hepatitis B surface antigen transcription.* Nature **305**: 336-338.
- Cattaneo, R., Will, H. und Schaller, H. (1984).** *Hepatitis B virus transcription in the infected liver.* EMBO J. **3**: 2191-2196.
- Chang, M.P., Mallet, W.G., Mostov, K.E. und Brodsky, F.M. (1993).** *Adaptor self-aggregation, adaptor-receptor recognition and binding of alpha-adaptin subunits to the plasma membrane contribute to recruitment of adaptor (AP2) components of clathrin-coated pits.* EMBO-J. **12**: 2169-2180.
- Chang, S.F., Netter, H.J., Bruns, M., Schneider, R., Frölich, K. und Will, H. (1999).** *A new avian hepadnavirus infecting snow geese (*Anser caerulescens*) produces a significant fraction of virions containing single-stranded DNA.* Virology **262**: 39-54.
- Chapman, H.A. (1998).** *Endosomal proteolysis and MHC class II function.* Curr. Opin. Immunol. **10**: 93-102
- Chen, H.S., Kaneko, S., Girones, R., Anderson, R.W., Hornbuckle, W.E., Tennant, B.C., Cote, P.J., Purcell, R.H. und Miller, R.H. (1993).** *The woodchuck hepatitis virus X gene is important for establishment of virus infection in woodchucks.* J. Virol. **67**: 1218-26
- Chisari, F.V. und Ferrari, C. (1995).** *Hepatitis B virus immunopathogenesis.* Annu. Rev. Immunol. **13**: 29-60.
- Chisari, F.V., Fillipi, P., Buras, J., McLachlan, A., Popper, H., Pinkert, C.A., Palmiter, R.D. und Brinster, R.L. (1987).** *Structural and pathological effects of synthesis of hepatitis B virus large envelope polypeptide in transgenic mice.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**: 6909-6913.
- Conway, J.F., Cheng, N., Zlotnick, A., Wingfield, P.T., Stahl, S.J. und Steven, A.C. (1997).** *Visualization of a 4helix bundle in the hepatitis B virus capsid by cryo-electron microscopy.* Nature **386**: 91-94.
- Cremona, O. und De Camilli, P. (1997).** *Synaptic vesicle endocytosis.* Curr. Opin. Neurobiol. **7**: 323-330.
- Dane, D.S., Cameron, C.H. und Briggs, M. (1970).** *Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis.* Lancet **1**: 695- 698.
- Dash, S., Rao, K.V. und Panda, S.K. (1992).** *Receptor for pre-S1 (21-47) component of Hepatitis B virus on the liver cell: role in virus cell interaction.* J. Med. Virol. **37**: 116-21
- De Bruin, W., Leenders, W., Kos, T., Hertogs, K., Depla, E. und Yap, S.H. (1994).** *Hepatitis delta virus attaches to human hepatocytes via human liver endonexin II, a specific HBsAg binding protein.* J. Viral Hepatitis **1**: 33-38.
- De Meyer, S., Gong, Z.J., Sudwandhi, W., Van Pelt, J., Soumillion, A. und Yap, S.H. (1997).** *Organ and species specificity of hepatitis B virus (HBV) infection: a review of literature with special reference to preferential attachment of HBV to human hepatocytes.* J. Viral Hepatitis **4**: 145-153.
- De Tulleo, L. und Kirchhausen, T. (1998).** *The clathrin endocytic pathway in viral infection.* EMBO J. **17**: 4585-4593.
- Diamantis, I.D., McGandy, C.E., Chen, T.J., Liaw, Y.F., Gudat, F. und Bianchi, L. (1992).** *Hepatitis B X-gene expression in hepatocellular carcinoma.* J. Hepatol. **15**: 400-403.
- Dich, J., Vind, C. und Grunnet, N. (1988).** *Long-term culture of hepatocytes: effect of hormones on enzyme activities and metabolic capacity.* Hepatology **8**: 39-45.

- Dienstag, J.L. (1984).** *Immunologic mechanisms in chronic viral hepatitis.* In: Vyas, G.N., Dienstag, J.L. und Hoofnagle, J.H. (Hrsg.). Viral Hepatitis and Liver Disease, 135-166, Grune & Stratton, Orlando.
- Drapeau, G.R., Boily, Y. and Houmard, J. (1972).** *Purification and properties of an extracellular protease of Staphylococcus.* J. Biol. Chem. **247**: 6720-6
- Duffy, M.J. (1996).** *Proteases as prognostic markers in cancer.* Clin. Cancer Res. **2**: 613-8
- Eble, B.E., Lingappa, V.R. und Ganem, D. (1990).** *The N-terminal (pre-S2) domain of a hepatitis B virus surface glycoprotein is translocated across membranes by downstream signal sequences.* J. Virol. **64**: 1414-1419.
- Eble, B.E., Macrae, D.R., Lingappa, V.R. und Ganem, D. (1987).** *Multiple topogenic sequences determine the transmembrane orientation of hepatitis B surface antigen.* Mol. Cell. Biol. **7**: 3591-3601.
- Enders, G.H., Ganem, D. und Varmus, H.E. (1985).** *Mapping the major transcripts of ground squirrel hepatitis virus the presumptive template for reverse transcriptase is terminally redundant.* Cell **42**: 297-308.
- Enrich, C., Jachle, S. und Havel, R.J. (1996).** *The polymeric immunoglobulin receptor is the major calmodulin-binding protein in an endosome fraction from rat liver enriched in recycling receptors.* J. Hepatol. **24**: 226-232.
- Faraugi, A.F., Roychoudhury, S., Greenberg, R., Israel, J. und Shih, C. (1991).** *Replication-defective missense mutations within the terminal protein and spacer/intron regions of the polymerase gene of human hepatitis B virus.* Virology **183**: 764-768.
- Feitelson, M.A., Marion, P.L. und Robinson, W.S. (1982).** *Core particles of hepatitis B virus and Ground Squirrel hepatitis virus.* J. Virol. **43**: 687-696.
- Feitelson, M.A., Millman, I. und Blumberg, R. (1986).** *The hepadnavirus family: animal hepadnaviruses.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**: 2994-2997.
- Fernholz, D., Galle, P.R., Stemler, M., Brunetto, M., Bonino, F. und Will, H. (1993).** *Infectious hepatitis B virus variant defective in pre-S2 protein expression in a chronic carrier.* Virology **194**: 137-148.
- Fernholz, D., Stemler, M., Brunetto, M., Bonino, F. und Will, H. (1991).** *Replicating and virion secreting hepatitis B mutant virus unable to produce preS2 protein.* J. Hepatol. **13 Suppl. 4**: 102-104.
- Gagliardi, M.C., Nisini, R., Benvenuto, R., De Petrillo, G., Michel, M.L. und Barnaba, V. (1994).** *Soluble transferrin mediates targeting of hepatitis B envelope antigen to transferrin receptor and its presentation by activated T cells.* Eur. J. Immunol. **24**: 1372-1376.
- Galle, P.R., Hagelstein, J., Kommerell, B., Volkmann, M., Schranz, P. und Zentgraf, H.W. (1994).** *In vitro experimental infection of primary human hepatocytes with hepatitis B virus.* Gastroenterology **106**: 664-673.
- Gallina, A., Gazina, E. und Milanesi, G. (1995).** *A c-terminal preS1 sequence is sufficient to retain hepatitis B virus L protein in 293 cells.* Virology **213**: 57-69.
- Ganem, D. und Varmus, H.E. (1987).** *The molecular biology of hepatitis B viruses.* Ann. Rev. Biochem. **56**: 651-693.
- Gavilanes, F., Gonzalez, J.M. und Peterson, D.L. (1982).** *Structure of hepatitis B surface antigen.* J. Biol. Chem. **257**: 7770-7777.

- Gerin, J.L., Holland, P.V. und Purcell, R.H. (1971).** *Australia antigen: large-scale purification from human serum and biochemical studies of its proteins.* J. Virol. **7**: 569-576.
- Gerlich, W.H. und Thomssen, R. (1999).** *The viruses of hepatitis.* In: Oxford textbook of clinical hepatology. Bircher, J., Benhamou, J.P., McIntyre, N., Rizetto, M. und Rodés, J. (Hrsg.), Oxford Medical Publications, 2nd edition, Oxford University Press, Oxford. **Vol I**: 828-870.
- Gerlich, W.H. und Thomssen, R. (1975).** *Standardized detection of hepatitis B surface antigen: determination of its serum concentration in weight units per volume.* Develop. Biol. Standard. **30**: 78-87.
- Gerlich, W.H., Goldmann, U., Müller, R., Stibbe, W. und Wolf, W. (1982).** *Specificity and localization of the hepatitis B virus-associated protein kinase.* J. Virol. **42**: 761-766.
- Gerlich, W.H. und Robinson, W.S. (1980).** *Hepatitis B virus contains protein attached to the 5'terminus of its complete DNA-strand.* Cell **21**: 801-809.
- Geuze, H.J., Slot, J.W., Strous, G.J., Lodish, H.F. und Schwartz, A.L. (1983).** *Intracellular site of asialoglycoprotein receptor-ligand uncoupling: double-label immunoelectron microscopy during receptor-mediated endocytosis.* Cell **32**: 277-287.
- Geuze, H.J., Slot, J.W., Strous, G.J., Peppard, J., von Figura, K., Hasilik, A. und Schwartz, A.L. (1984).** *Intracellular receptor sorting during endocytosis: comparative immunoelectron microscopy of multiple receptors in rat liver.* Cell **37**: 195-204.
- Glebe, D. (2000).** *Oberflächenstrukturen des Hepatitis B Virus und ihre Bedeutung für den Infektionsvorgang.* Dissertation an der JLU Gießen, Fachbereich Biologie.
- Goldstein, J.L., Brown, M.S., Anderson, R.G., Russell, D.W. und Schneider, W.J. (1985).** *Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system.* Annu. Rev. Cell Biol. **1**: 1-39.
- Gong, Z.J., De Meyer, S., Van Pelt, J., Hertogs, K., Depla, E., Soumilion, A., Fevery, J. und Yap, S.H. (1999).** *Transfection of a rat hepatoma cell line with a construct expressing human liver annexin V confers susceptibility to hepatitis B virus infection.* Hepatology **29**: 576-584.
- Gough, N.M. (1983).** *Core and E antigen synthesis in rodent cells transformed with hepatitis B virus DNA is associated with greater than genome length viral messenger RNAs.* J. Mol. Biol. **165**: 683-699.
- Grethe, S., Heckel, J.O., Rietschel, W. und Hufert, F.T. (2000).** *Molecular epidemiology of hepatitis B virus variants in nonhuman primates.* J. Virol. **74**: 5377-81.
- Grgacic, E.V.L. und Schaller, H. (2000).** *A metastable form of the large envelope protein of duck hepatitis B virus: low-pH release Results in a Transition to a hydrophobic, potentially fusogenic conformation.* J. Virol. **74**: 5116-5122.
- Griffith, O.M. (1986).** *Techniques of Preparative, Zonal, and Continuous Flow Ultracentrifugation.* Applications Research Department Spinco Division. Beckman Instruments, Inc.
- Gripon, P., Le Seyec, J., Rumin, S. und Guguen-Guillouzo, C. (1995).** *Myristylation of the hepatitis B virus large surface protein is essential for viral infectivity.* Virology **10**: 292-299.
- Guerrero, E., Gavilanes, F. und Peterson, D. (1988).** *Model of the protein arrangement in HBsAg particles based on physical and chemical studies.* In: Zuckerman, A.J. (Hrsg.). Viral Hepatitis and Liver Disease, 606-613, New York, Liss.

- Hagelstein, J., Fathinejad, F., Stremmel, W. und Galle, P.R. (1997).** *pH-independent uptake of hepatitis B virus in primary human hepatocytes.* Virology **229**: 292-294.
- Hanover, J.A. und Dickson, R.B. (1985).** *Transferrin-receptor mediated endocytosis and iron delivery.* In: Pastan, I., Willingham, W.C. (Hrsg.). Endocytosis. New York Plenum: 131-161.
- Heermann, K.H., Goldmann, U., Schwartz, W. Seyffarth, T., Baumgarten, H. und Gerlich, W.H. (1984).** *Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-S sequence.* J. Virol. **52**: 396-402.
- Heermann, K.H., Kruse, F., Seifer, M. und Gerlich W.H. (1987).** *Immunogenicity of the gene S and pre-S domains in hepatitis B virions and HBsAg filaments.* Intervirology **28**: 14.
- Helenius, A., Marsh, M. und White, J. (1982).** *Inhibition of Semliki forest virus penetration by lysosomotropic weak bases.* J. Gen. Virol. **58**: 47-61.
- Henkler, F., Lopes, A.R., Jones, M. und Koshy, R. (1998).** *Erk-independent partial activation of AP-1 sites by the hepatitis B virus HBx protein.* J. Gen. Virol. **79**: 2737-42
- Henkler, F., Waseem, N., Golding, M.H., Alison, M.R. und Koshy, R. (1995).** *Mutant p53 but not hepatitis B virus X protein is present in hepatitis B virus related human hepatocellular carcinoma.* Cancer Res. **55**: 6084-6091.
- Hertogs, K., Depla, E., Crabbe, T., De Bruin, W., Leenders, W., Moshage, H. und Yap, S.H. (1994).** *Spontaneous development of anti-hepatitis B virus envelope (anti-idiotypic) antibodies in animals immunized with human liver endonexin II or with F(ab')₂ fragment of anti-human liver endonexin II immunoglobulin G: evidence for a receptor-ligand-like relationship between small hepatitis B surface antigen and endonexin II.* J. Virol. **68**: 1516-1521.
- Hild, M., Swamaye, I., Schneider-Mergener, J. und Schaller, H. (1995).** *Characterisation of Hsc70 binding sites in the DHBV L-Protein.* Abstract in: The meeting on the molecular biology of hepatitis B viruses, 23-27.7.1995, San Diego, USA.
- Hirsch, R.C., Lavine, J.E., Chang, L., Varmus, H.E. und Ganem, D. (1990).** *Polymerase gene products of hepatitis B viruses are required for genomic RNA packaging as well as for reverse transcription.* Nature **344**: 552-555.
- Honing, S., Kreimer, G., Robenek, H. und Jockusch, B.M. (1994).** *Receptor-mediated endocytosis is sensitive to antibodies against the uncoating ATPase (hsc70).* J. Cell Sci. **107**: 1185-1196.
- Hruska, F.J., Clayton, D.A., Rubenstein, J.L.R. und Robinson, W.S. (1977).** *Structure of hepatitis B Dane particle DNA before and after Dane particle DNA polymerase reaction.* J. Virol. **21**: 666-672.
- Hu, J., Toft, D.O. und Seeger, C. (1997).** *Hepadnavirus assembly and reverse transcription require a multi-component chaperone complex which is incorporated into nucleocapsids.* EMBO J. **16**: 59-68.
- Huang, J. und Liang, T.J. (1993).** *A novel hepatitis B Virus (HBV) genetic element with Rev response element-like properties that is essential for expression of HBV gene products.* Mol. Cell. Biol. **13**: 7476-7486.
- Ishikawa, T., Kuroki, K., Lenhoff, R., Summers, J. und Ganem, D. (1994).** *Analysis of the binding of a host cell surface glycoprotein to the preS protein of duck hepatitis B virus.* Virology **202**: 1061-1064.
- Jursch, C. (2000).** *Größenbestimmung von Viren in menschlichem Blutplasma durch Ausschlusschromatographie.* Dissertation an der JLU Gießen, Fachbereich Biologie.

- Kaboth, U. (1980).** *Kooperative prospektive Studie "Akute Virushepatitis" (DFG).* In: Verhandlungen der deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, Bd **86**: 9749-9756, Bergmann Verlag, München.
- Kaneko, S. und Miller, R.H. (1988).** *X-region-specific transcript in mammalian hepatitis B virus-infected liver.* J. Virol. **62**: 3979-3984.
- Kann, M. und Gerlich, W.H. (1998).** *Hepadnaviridae - Structure and Molecular Virology.* In: A.J. Zuckermann and K.C. Thomas. (Hrsg.), Viral Hepatitis 2nd ed. chr.7 Churchill-Lewingstone New York: 77-105
- Kann, M. und Gerlich, W.H. (1994).** *Effect of core protein phosphorylation by protein kinase C on encapsidation of RNA within core particles of hepatitis B virus.* J. Virol. **68**: 7993-8000.
- Kaplan, P.M., Greenman, R.L., Gerin, J.L., Purcell, R.H. und Robinson, W.S. (1973).** *DNA-Polymerase associated with human hepatitis B antigen.* J. Virol. **12**: 995-1005.
- Kaplan, P.M., Ford, E.C., Purcell, R.H. und Gerin, J.L. (1975).** *Demonstration of subpopulations of Dane particles.* J. Virol. **17**: 885-893.
- Köck, J., Borst, E.M. und Schlicht, H.J. (1996).** *Uptake of duck hepatitis B virus into hepatocyte occurs by endocytosis but does not require passage of the virus through an acidic intracellular compartment.* J. Virol. **70**: 5827-5831.
- Köck, J. und Schlicht, H.J. (1993).** *Analysis of the earliest steps of hepadnavirus replication: genome repair after infectious entry into hepatocytes does not depend on viral polymerase activity.* J. Virol. **67**: 4867-4874.
- Krone, B., Lenz, A., Heermann, K.H., Seifer, M., Lu, X. und Gerlich, W.H. (1990).** *Interaction between hepatitis B surface proteins and monomeric human serum albumin.* Hepatology **11**: 1050-1056.
- Kuroki, K., Cheung, R., Marion, P.L. und Ganem, D. (1994).** *A cell surface protein that binds avian hepatitis B virus particles.* J. Virol. **68**: 2091-6
- Kuroki, K., Eng, F., Ishikawa, T., Turck, C., Harada, F. und Ganem, D. (1995).** *Gp180, a host cell glycoprotein that binds duck hepatitis B virus particles, is encoded by a member of the carboxypeptidase gene family.* J. Biol. Chem. **270**: 15022-15028.
- Landers, T.A., Greenberg, H.B. und Robinson, W.S. (1977).** *Structure of hepatitis B Dane particle DNA and nature of the endogenous DNA polymerase reaction.* J. Virol. **23**: 368-376.
- Lanford, R.E., Chavez, D., Brasky, K.M., Burns, R.B. und Rico-Hesse, R. (1998).** *Isolation of a hepadnavirus from wooly monkey, a New World primate.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**: 5757-61
- Le Bouvier, G.L. (1972).** *Seroanalysis by immunodiffusion: The subtypes of type B hepatitis B virus.* In: Vyas, G.N., Perkins, A. und Schmitt, R. (Hrsg.). Hepatitis and Blood Transfusion, 97-110, Grune & Stratton, New York.
- Li, J.S., Tong, S.P. und Wands, J.R. (1996).** *Characterization of a 120-kilodalton pre-S-binding protein as a candidate duck hepatitis b virus receptor.* J. Virol. **70**: 6029-35.
- Li, J., Tong, S. und Wands, J.R. (1999).** *Identification and expression of glycyl decarboxylase (p120) as a duck hepatitis b virus pre-S envelope-binding protein.* J. Biol. Chem. **274**: 27658-65.
- Li, L., Dixon, R.J., Gu, X. und Newbold, J.E. (1998).** *Comparison of the DNA sequences of the Grey Teal, Maned Duck and Duck Hepatitis B Virus.* Abstract in: The Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, 30.8.-3.9.1998, San Diego (USA).

Lowry, O.H., Osebrough, N.J., Farr, A.L. und Randall, R.J. (1951) *Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.* J. Biol. Chem. **193**: 265-275

Lu, X., Block, T. und Gerlich, W.H. (1996). *Protease-induced infectivity of hepatitis B virus for a human hepatoblastoma cell line.* J. Virol. **70**: 2277-2285.

Machida, A., Kishimoto, S., Ohnuma, H., Baba, K., Ito, Y., Miyamoto, H., Funatsu, G., Oda, K., Usuda, S., Togami, S., Nakamura, T., Miyakawa, Y. und Mayumi, M. (1984). *A polypeptide containing 55 amino acid residues coded by the pre-S region of hepatitis B virus deoxyribonucleotide acid bears the receptor of polymerized human as well as chimpanzee albumins.* Gastroenterology **86**: 910-918.

Macrae, D.R., Bruss, V. und Ganem, D. (1991). *Myristylation of a duck hepatitis B virus envelope protein is essential for infectivity but not for virus assembly.* Virology **181**: 359-363.

Magnius, L.O. und Espmark, J.A. (1972). *New specificities in Australia antigen positive sera distinct from the Le Bouvier determinants.* J. Immunol. **109**: 1017-1021.

Maguire, H.F., Hoeffler, T.P. und Siddiqui, A. (1991). *HBV X protein alters the DNA binding specificity of CREB ATF-2 by protein-protein interactions.* Science **252**: 842-844.

Marion, P.L., Oshira, L., Regnery, D.C., Scullard, G.H. und Robinson, W.S. (1980). *A virus in Beechy and ground squirrels that is related to hepatitis B virus of man.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**: 2941-2945.

Marsh, M. (1993). *Biochemical and morphological assays of virus entry.* Methods Enzymol. **220**: 249-261.

Marquardt, O., Heermann, K.H., Seifer, M. und Gerlich, W.H. (1987). *Cell type specific expression of preS1 antigen and secretion of hepatitis B virus surface antigen.* Arch. Virol. **96**: 249-256.

Mason, W.S., Seal, G. und Summers, J. (1980). *Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus.* J. Virol. **36**: 829-836.

Mehdi, H., Kaplan, M.J., Anlar, F.Y., Yang, X., Bayer, R., Sutherland, K. und Peeples, M.E. (1994). *Hepatitis B virus surface antigen binds to apolipoprotein H.* J. Virol. **68**: 2415-2424.

Mehdi, H., Yang, X. und Peeples, M.E. (1996). *An altered form of apolipoprotein H binds hepatitis B virus surface antigen most efficiently.* Virology **217**: 58-66.

Milich, D.R. (1999). *Do T cells "see" the hepatitis B core and e antigens differently?* Gastroenterology **116**: 765-8.

Milich, D.R., Thornton, G.B., Neurath, A.R., Kent, S.B., Michel, M.L., Tiollais, P. und Chsari, F.V. (1985). *Enhanced immunogenicity of the pre-S region of hepatitis B surface antigen.* Science **228**: 1195-1199

Nagai, Y. (1993). *Protease-dependent virus tropism and pathogenicity.* Trends Microbiol. **1**: 81-7

Neurath, A.R., Kent, S.B.H., Strick, N. und Parker, K. (1986). *Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus.* Cell **46**: 429-436.

Neurath, A.R., Strick, N. und Sproul, P. (1992). *Search for hepatitis B virus cell receptors reveals binding sites for interleukin 6 on the virus envelope protein.* J. Exp. Med. **175**: 461-469.

Newbold, J.E., Xin, H., Tencza, M., Sherman, G., Dean, J., Bowden, S. und Locarnini, S. (1995). *The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists in situ as a heterogeneous population of viral minichromosomes.* J. Virol. **69**: 3350-3357.

- Norder, H., Ebert, J.W., Fields, H., Mushawar, I.K. und Magnius, L.O. (1996). *Complete Sequencing of a Gibbon Hepatitis B Virus Genome Reveals a Unique Genotype Distantly Related to the Chimpanzee Hepatitis B Virus*. Virology **218**: 214-223.
- Ohkuma, S. und Poole, B. (1981). *Cytoplasmic vacuolation of mouse peritoneal macrophages and the uptake into lysosomes of weakly basic substances*. J. Cell Biol. **90**: 656-664.
- Ostapchuk, P., Hearing, P. und Ganem, D. (1994). *A dramatic shift in the transmembrane topology of a viral envelope glycoprotein accompanies hepatitis B viral morphogenesis*. EMBO J. **13**: 1048-1057.
- Pasek, M., Goto, T., Gilbert, W., Zink, B., Schaller, H., Mackay, P., Leadbetter, G. und Murray, K. (1979). *Hepatitis B virus genes and their expression in E.coli*. Nature **282**: 575-579.
- Patki, V., Virbasius, J., Lane, W.S., Toh, B.H., Shpetner, H.S. und Corvera, S. (1997). *Identification of an early endosomal protein regulated by phosphatidylinositol 3kinase*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 7326-7330.
- Patzer, E.J., Nakamura, G.R., Simonsen, C.C., Levinson, A.D. und Brands, R. (1986). *Intracellular assembly and packaging of hepatitis B surface antigen particles occur in the endoplasmic reticulum*. J. Virol. **58**: 884-892.
- Persing, D.H., Varmus, H.E. und Ganem, D. (1987). *The pre-S1 protein of hepatitis B virus is acylated at its amino terminus with myristic acid*. J.Virol. **61**: 1672-1677.
- Persing, D.H., Varmus, H.E. und Ganem, D. (1986). *Inhibition of secretion of hepatitis B surface antigen by a related presurface polypeptide*. Science **234**: 1388-1391.
- Persson, B. und Argos, P. (1994). *Prediction of transmembrane segments in proteins utilising multiple sequence alignments*. J. Mol. Biol. **237**: 182-192.
- Peterson, D.L. (1981). *Isolation and characterization of the major protein and glycoprotein of hepatitis B surface antigen*. J. Biol. Chem. **256**: 6975-6983.
- Petit, M.A., Capel, F., Dubanchet, S. und Mabit, H. (1992). *PreS1-specific binding proteins as potential receptors for human hepatitis B virus in human hepatocytes*. Virology **187**: 211-222.
- Pierre, P., Scheel, J., Rickard, J.E. und Kreis, T.E. (1992). *CLIP-170 links endocytic vesicles to microtubules*. Cell **70**: 887-900.
- Pol, A. und Enrich, C. (1997). *Membrane transport in rat liver endocytic pathways: preparation, biochemical properties and functional roles of hepatic endosomes*. Electrophoresis **18**: 2548-2557.
- Pontisso, P., Petit, M.A., Bankowski, M.J. und Peebles, M.E. (1989). *Human liver plasma membranes contain receptors for the hepatitis B virus pre-S1 region and, via polymerized human serum albumin, for the pre-S2 region*. J. Virol. **63**: 1981-1988.
- Pontisso, P., Ruvoletto, M.G., Tiribelli, C., Gerlich, W.H., Ruol, A. und Alberti, A. (1992). *The preS1 domain of hepatitis B virus and IgA cross-react in their binding to the hepatocyte surface*. J. Gen. Virol. **73**: 2041-2045.
- Pourcel, C., Louise, A., Gervais, M., Chenciner, N., Dubois, M.F. und Tiollais, P. (1982). *Transcription of the hepatitis B surface antigen gene in mouse cells transformed with cloned viral DNA*. J. Virol. **42**: 100-105.
- Prange, R. und Streeck, R.E. (1995). *Novel transmembrane topology of the hepatitis B virus envelope proteins*. EMBO J. **14**: 247-256.

- Pult, I., Netter, H.J., Fröhlich, K., Kaleta, E.F. und Will, H. (1998). *Identification, Structural, and Functional Analysis of a new Avian Hepadnavirus from Storks (STHBV)*. Abstract aus: The Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, San Diego, USA.
- Qiao, M., Macnaughton, T.B. und Gowans, E.J. (1994). *Adsorption and penetration of hepatitis B virus in a nonpermissive cell line*. Virology **201**: 356-363.
- Radziwill, G., Tucker, W. und Schaller, H. (1990). *Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity*. J. Virol. **64**: 613-620.
- Rall, L.B., Standring, D.N. und Laub, O. (1983). *Transcription of hepatitis B virus by RNA polymerase II*. Mol. Cell. Biol. **3**: 1766-1773.
- Rickwood, D. und Hames, B.D. (1992). *Preparative Centrifugation A Practical Approach*. IRL Press, at Oxford University Press
- Rigg, R.J. und Schaller, H. (1992). *Duck hepatitis B virus infection of hepatocytes is not dependent on low pH*. J.Virol. **66**: 2829-2836.
- Ritter, S.E., Whitten, T.M., Quents, A.T. und Schloemer, R.H. (1991). *An internal domain of hepatitis B virus X antigen is necessary for transactivating activity*. Virology **182**: 841-845.
- Robinson, W.S. (1977). *The genome of hepatitis B virus*. Ann. Rev. Microbiol. **31**: 357-377.
- Robinson, W.S., Clayton, D.A. und Greenman, R.L. (1974). *DNA of a human hepatitis B virus candidate*. J. Virol. **14**: 384-391.
- Robinson, W.S. (1991). *Hepadnaviridae and their replication*. In: Fundamental Virology 2nd Ed pp. 989-1021, Fields, B.N. and Knipe, D.N., Raven Press, New York.
- Rohde, W., Boscheck, C.B., Harms, E., Rott, R. und Scholtissek, C. (1979). *Characterization of virus-like particles produced by an influenza A virus*. Arch. Virol. **62**: 291-302.
- Rodriguez-Crespo, I., Nunez, E., Yelamos, B., Gomez-Gutierrez, J., Albar, J.P., Peterson, D.L. und Gavilanes, F. (1999). *Fusogenic activity of hepadnavirus peptides corresponding to sequences downstream of the putative cleavage site*. Virology **261**: 133-42.
- Ryu, C.J., Cho, D.Y., Gripon, P., Kim, H.S., Guguen-Guillouzo, C. und Hong, H.J. (2000). *An 80-kilodalton protein, that binds to the pre-S1 Domain of hepatitis B virus*. J. Virol. **74**: 110-116.
- Sattler, F. und Robinson, W.S. (1979). *Hepatitis B viral DNA have cohesive ends*. J.Virol. **32**: 226-233.
- Schaefer, S. und Gerlich, W.H. (1995). *In vitro transformation by hepatitis B virus DNA*. Intervirology **38**: 143-54.
- Schlicht, H.J., Esser, A., Bartenschlager, R., Galle, P., Kuhn, C., Nassal, M., Niepmann, M., Radziwill, G. und Schaller, H. (1989). *Unravelling the life cycle of hepatitis B viruses*. In: *Liver cell carcinoma 1st Ed*. pp. 79-91. Bannasch, P., Keppler, D. und Weber, G. (Hrsg.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Schmitt, S., Glebe, D., Alving, K., Tolle, T.K., Linder, M., Geyer, H., Linder D., Peter-Katalinic, J., Gerlich, W.H. und Geyer, R. (1999). *Analysis of the PreS2 N and O-linked glycans of the M surface protein from human hepatitis B virus*. J. Biol. Chem. **274**: 476-482.

- Seeger, C., Ganem, D. und Varmus, H.E. (1986).** *Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy.* Science **232**: 477-484.
- Seeger, C. und Hu, J. (1997).** *Why are hepadnaviruses DNA and not RNA viruses.* Trends in Microbiology **11**: 447-450.
- Seifer, M., Heermann, K.H. und Gerlich, W.H. (1990).** *Expression pattern of the hepatitis B virus genome in transfected mouse fibroblasts.* Virology **179**: 300-311.
- Sells, M.A., Chen, M.-L. und Acs, G. (1987).** *Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**: 1005-1009.
- Shaul, Y., Rutter, W.J. und Laub, O. (1985).** *A human hepatitis B virus enhancer element.* EMBO J. **4**: 427-430.
- Siddiqui, A., Sattler, F.R. und Robinson, W.S. (1979).** *Restriction endonuclease cleavage map and location of unique features of the DNA of hepatitis B virus subtype adw2.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**: 4664-4668 .
- Sobotta, D. (1999).** *Molekulare Charakterisierung der Oberflächenproteine des Hepatitis B Virus mit Hilfe monoklonaler Antikörper und Proteasen.* Dissertation an der JLU Gießen, Fachbereich Biologie.
- Sobotta, D., Sominskaya, I., Jansons, J., Meisel, H., Schmitt, S., Heermann, K.-H., Kaluza, G., Pumpens, P. und Gerlich, W.H. (2000).** *Mapping of immunodominant B-cell epitopes and the human serum albumin-binding site in natural hepatitis B virus surface antigen of defined genosubtype.* J. Gen. Virol. **81**: 369-378
- Sminskaya, I., Bichko, V., Pushko, P., Dreimane, A., Snikere, D. und Pumpens, P. (1992).** *Tetrapeptide QDPR is a minimal immunodominant epitope within the preS2 domain of hepatitis B virus.* Immunol. Lett. **33**: 169-72
- Sonveaux, N., Thines, D. und Ruyschaert, J.M. (1995).** *Characterization of the HBsAg particle lipid membrane.* Res. Virol. **146**: 43-51.
- Standring, D.N., Rutter, W.J., Varmus, H.E. und Ganem, D. (1984).** *Transcription of the hepatitis B surface antigen gene in cultured murine cells initiates within the presurface region.* J. Virol. **50**: 563-571.
- Standring, D.N., Ou, J.H., Masiarz, F.R. und Rutter, W.J. (1988).** *A signal peptide encoded within the precore region of hepatitis B virus directs the secretion of a heterogeneous population of e antigens in Xenopus oocytes.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**: 8405-8409.
- Stibbe, W. und Gerlich, W.H. (1983).** *Structural relationship between minor and major proteins of hepatitis B surface antigen.* J. Virol. **46**: 626-628.
- Stibbe, W. und Gerlich, W.H. (1982).** *Variable protein composition of hepatitis B surface antigen from different donors.* Virology **123**: 424-436.
- Stirk, H.J., Thornton, J.M. und Howard, C.R. (1992).** *A topological model of hepatitis B surface antigen.* Intervirology **33**: 148-158.
- Su, Q., Schröder, C.H., Hofmann, W.J., Otto, G., Pichlmayer, R. und Bannasch, P. (1998).** *Expression of hepatitis B virus X protein in HBV-infected human livers and hepatocellular carcinomas.* Hepatology **27**: 1109-1120.
- Summers, J. (1984).** *Replication of hepatitis B viruses.* In: Vyas, G.N., Dienstag, J.L. und Hoofnagle, J.H. (Hrsg.). Viral Hepatitis and Liver Disease, 87-96, Grune & Stratton, Orlando, USA.
- Summers, J. und Mason, W.S. (1982).** *Replication of the genome of hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate.* Cell **29**: 403-415.

- Summers, J., Smolec, J.M. und Snyder, R. (1978).** *A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**: 4533-4537.
- Summers, J.A., O'Connell, A. und Millman, I. (1975).** *Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **72**: 4597-4601.
- Sureau, C. und Lanford, R. (1993).** *Analysis of hepatitis B virus envelope proteins in assembly and infectivity of human hepatitis delta virus.* Prog. Clin. Biol. Res. **382**: 45-51.
- Synnes, M., Prydz, K., Lovdal, T., Brech, A. und Berg, T. (1999).** *Fluid phase endocytosis and galactosyl receptor-mediated endocytosis employ different early endosomes.* Biochem. Biophys. Acta **1421**: 317-328.
- Testut, P., Renard, C.-A., Terradillos, O., Vitvitski-Trepo, L., Takaia, F., Degott, C., Blake, J., Boyer, B. und Buendia, M.A. (1996).** *A New Hepadnavirus Endemic in Arctic Ground Squirrels in Alaska* J. Virol. **70**: 4210-4219.
- Thung, S.N. und Gerber, M.A. (1984).** *Polyalbumin receptors: their role in the attachment of hepatitis B virus to hepatocytes.* Semin Liver Dis. **4**: 69-75
- Tiollais, P. Charnay, P. und Vyas, G.N. (1981).** *Biology of hepatitis B virus.* Science **213**: 406-411.
- Treichel, U., Meyer zum Büschenfelde, K.H., Stochert, R.S., Poralla, T. und Gerken, G. (1994).** *The asialoglycoproteinreceptor mediates hepatic binding and uptake of natural hepatitis B virus particles derived from viraemic carriers.* J. Gen. Virol. **75**: 3021-3029.
- Treinin, M. und Laub, O. (1987).** *Identification of a promotor element located upstream from the hepatitis B virus X gene.* Mol. Cell. Biol. **7**: 545-548.
- Trevisan, A., Cavigli, R., Stenico, D., Casara, D., Pasquali, C. und Capri, C. (1988).** *Hepatocyte receptors for polymerized albumin. Experimental study on isolated hepatocytes and in vivo animals.* Minerva Med. **79**: 81-90.
- Turner, A.J. und Tanzawa, K. (1997).** *Mammalian membrane metallopeptidases: NEP, ECE, KELL and PEX.* FASEB J. **11**: 355-64.
- Ungewickell, E. und Branton, D. (1981).** *Assembly units of clathrin coats.* Nature **289**: 420-422.
- Ungewickell, E., Ungewickell, H., Holstein, S.E., Lindner, R., Prasad, K., Barouch, W., Martin, B., Greene, L.E. und Eisenberg, E. (1995).** *Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles.* Nature **278**: 632-635.
- Urban, S., Breiner, K.M., Fehler, F., Klingmüller, U. und Schaller, H. (1998).** *Avian Hepatitis B Virus infection is initiated by the interaction of a distinct Pre-S subdomain with the cellular receptor gp 180.* J. Virol. **72**: 8089-8097
- Valenzuela, P., Gray, P., Quiroga, M., Zaldivar, J., Goodman, H.M. und Rutter, W.J. (1979).** *Nucleotide sequence of the gene coding for the major protein of hepatitis B virus surface antigen.* Nature **280**: 815-819.
- Vaudin, M., Wolstenholme, A.J., Tsiquaya, K.N., Zuckermann, A.J. und Harrison, T.J. (1988).** *The complete nucleotide sequence of genome of a hepatitis B virus isolated from a naturally infected chimpanzee.* J. Gen. Virol. **69**: 1383-9.
- Warnock, D.G. (1999).** *Regulation of endosomal acidification via Gi-type protein.* Kidney Int. **55**: 2524-2525.

- Warren, K.S., Heeney, J.L., Swan, R.A., Heriyanto und Verschoor, E.J. (1999).** *A new group of hepadnaviruses naturally infecting orangutans (Pongo pygmaeus).* J. Virol. **73**: 7860-5
- Watts, C. und Marsh, M. (1992).** *Endocytosis: what goes in and how ?* J. Cell Sci. **103**: 1-8.
- Will, H., Reiser, W., Weimer, T., Pfaff, E., Büscher, M., Sprengel, R., Cattaneo, R. und Schaller, H. (1987).** *Replication strategy of human hepatitis B virus.* J. Virol. **61**: 904-911.
- Yaginuma, K., Shirakata, Y., Kobayashi, M. und Koike, K. (1987).** *Hepatitis B virus (HBV) particles are produced in a cell culture system by transient expression of transfected HBV DNA.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**: 2678-2682.
- Yamaki, M., Otori, H., Onodera, S., Ishida, N. und Maeda, H. (1982).** *Circular dichroism and biochemical properties of hepatitis B virus core antigen.* Biochem. Biophys. Acta **706**: 165-173.
- Yu, M.W., Finlayson, J.S. und Shih, J.W.K. (1985).** *Interaction between various polymerized human albumins and hepatitis B surface antigen.* J. Virol. **55**: 736-743
- Yuh, C.H., Chang, Y.L. und Ting, L.P. (1992).** *Transcriptional regulation of precore and pregenomic RNA's of hepatitis B virus.* J. Virol. **66**: 4073-4084.
- Zang, W.Q., Fieno, A.M., Grant, R.A. und Yen, T.S. (1998).** *Identification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a cellular protein that binds to the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element.* Virology **248**: 46-52.
- Zhou, D.X. und Yen, T.S.B. (1990).** *Differential regulation of the hepatitis B virus surface gene promoters by a second viral enhancer.* J. Biol. Chem. **265**: 20731-20734.
- Zoulim, F., Saputelli, J. und Seeger, C. (1994).** *Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo.* J. Virol. **68**: 2026-30.

7 Abkürzungen

A	Alanin
A	Amper
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Ag	Antigen
Anti-	Antikörper gegen
AMPS	Ammoniumpersulfat
AP	Alkalische Phosphatase
AP	Adapterprotein
ASHV	Arctic Groundsquirrel Hepatitis
Asn	Asparagin
ATP	Adenosintriphosphat
AuAg	Australia Antigen
bp	Basenpaar
BCA	Bicinchoninic acid
BF	Binding Factor
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Core
c	Centi (10^{-1})
ca.	circa
ccc	covalently closed circular
°C	Grad Celsius
CURL	Compartment of the uncoupling of receptor-ligand
d	Schichtdicke
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
d.h.	das heißt
DHBV	Duck Hepatitis B Virus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DR	Direct repeat
ds	double strand
E	Envelop Glycoprotein
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEA 1	Early Endosome Antigen 1
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EM	Elektronen Mikroskopie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	et alia, und andere
evt.	eventuell
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GTP	Guanosintriphosphat
gp	Glykoprotein

GLDH	Glutamat-Dehydrogenase
GRE	Glucocorticoid responsible element
GSHV	Ground Squirrel Hepatitis Virus
GTHBV	Grey Teal Hepatitis B Virud
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HBc	Hepatitis-B-Core-Protein
HBe	Hepatitis-B-e-Protein
HBs	Hepatitis-B-Surface-Protein
HBx	Hepatitis-B-X-Protein
HBV	Hepatitis B Virus
HDL	High Density Lipoprotein
HHBV	Heron-Hepatitis-B-Virus
HSA	Humanes Serum Albumin
HSC	Heat shock cognate
HSP	Heat shock protein
IgA	Immunglobuline
IL	Interleukin
k	kilo (10^3)
kb	kilo Basen
kDa	kilo Dalton
l	Liter
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LDL	Low Density Lipoprotein
LHBs	Large Hepatitis B surface protein
λ	Wellenlänge
m	Milli (10^{-3})
m	meter
μ	Mikro (10^{-6})
M	Marker
M	Molar
mAK	monoklonaler Antikörper
max.	maximal
MDHBV	Maned Duck Hepatitis B Virus
MHBs	Middle Hepatitis-B-surface-protein
min.	Minute
mind.	mindestens
Mio.	Million
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MVB	Multivesicular bodies
n	Nano (10^{-9})
N-	Amino-
OD	Optische Dichte
OPD	ortho-Phenylendiamin
ORF	Open reading frame
P	Polymerase
p	Protein
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung

PK	Proteinkinase
POD	Peroxidase
Pol.	Polymerase
Pos.	Position
PRE	Post-translational Regulatory Element
Pri	Primer-Protein
R	Arginin
RGHV	Ross Goose Hepatitis Virus
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	round per minute
RRC	Receptor Recycling Compartment
RT	Reverse Transkriptase
S	Surface (Hülle)
SDS	Sodium dodecylsulfat
sec.	Sekunde
SGHBV	Snow Goose Hepatitis B Virus
SHBs	Small-Hepatitis-B-surface-protein
s.o.	siehe oben
SP	saure Phosphatase
ss	single strand
STHBV	Stork Hepatitis B Virus
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N' Tetramethylethlendiamin
TGN	Trans Golgi Netzwerk
Thr	Threonin
TNE	Tris Natrium EDTA
U	Unit
u.	und
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
vDNA	virale Desoxyribonukleinsäure
VP	Virales Protein
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
WHV	Woodchuck-Hepatitis Virus
WHO	World-Health-Organisation
WMHBV	
X	X-Protein
z.B.	zum Beispiel

Danksagung

Hiermit möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Die Arbeit wurde am Institut für Medizinische Virologie des Klinikums der JLU Gießen unter der Leitung von Prof. Dr. W.H. Gerlich durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. W.H. Gerlich danke ich für die interessante Themenstellung und die stete Diskussionsbereitschaft beim Erstellen dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. A. Pingoud, Institut für Biochemie, gilt mein Dank für die Vertretung und Begutachtung der Arbeit vor dem Fachbereich Biologie der JLU Gießen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Tanja. K. Tolle, die mit viel persönlichem Engagement zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Herrn Dr. Dieter Glebe, Herrn Dr. Stephan Schaefer und Herrn Dr. Andreas Berting danke ich für ihr stetes Interesse an dieser Arbeit und die zahlreichen Denkanstöße.

Frau Sigrun Broehl danke ich für die Einführung in die Welt der Zellkultur und die Unterstützung bei der Bearbeitung der vielen Zellkulturschalen.

Herrn Dr. Dirk Sobotta und Frau Ulrike Wend danke ich für die Herstellung der verschiedenen monoklonalen Antikörper.

Zusätzlich möchte ich allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Virologie für das sehr gute Arbeitsklima danken.

Meinen Eltern Gerhard und Ursula Mest gilt mein besonderer Dank, da ohne ihre zahlreichen Unterstützungen diese Arbeit nicht möglich geworden wäre.

Meinem Mann Joachim Nitsche möchte ich für sein Verständnis und seine liebevolle Unterstützung beim Anfertigen dieser Arbeit danken.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides Statt
die vorliegende Arbeit selbständig ausgeführt
und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel
verwendet zu haben

Sylvia Nitsche